生物技术通报
SHENGWU JISHU TONGBAO
2026 年 第 42 卷 第 10 期
（总第411期）

目 次

综述与专论

植物再生与遗传转化技术:从经验摸索到理性设计…… 张婉钰 邢俊强 孙勤富 王幼平（1）

类胡萝卜素调控植物花色和果色机制研究进展…… 李富伟 李宏宇（13）

技术与方法

基于重测序的番茄全基因组InDel分子标记开发与应用
…… 苏晓梅 刘淑梅 吕宏君 杨宗辉 侯丽霞（27）

基于复合菌的玉米芯发酵工艺构建与优化
…… 陈文燕 周瑞 吴慧昊 李耀东 杨婕 臧荣鑫 徐红伟（37）

基于酿酒酵母克隆与错位热循环连接的环状全长人类线粒体DNA制备
…… 彭文慧 李冠初 刘永敏 马文建 郭晓贤（47）

研究报告

基于WGCNA的玉米雄穗耐热相关共表达模块鉴定和核心基因发掘
…… 秦天元 吕玉平 阿不来提·阿布拉 韩登旭 董远 张雪 杨杰（55）

谷子*SiGeBP*基因家族生物信息学及表达分析
…… 曹海艳 张子彤 孟子钰 宋继策 郝雪峰 金竹萍（67）

燕麦盐碱响应基因*AsGolS2*的克隆及互作蛋白的筛选…… 孙金梁 李星岩 张碧茹 米俊珍 刘景辉（77）

燕麦溶血磷脂酸酰基转移酶*AsLPAAT5*基因克隆与功能分析
…… 胡荣芳 丁家豪 马菊花 谭辉进 宋亚楠 薛金爱（88）

藜麦*G6PDH*基因家族的鉴定及*CqG6PDH1*耐盐性分析
…… 王亦学 刘佳慧 许帆 胡鑫 王育川 侯丽媛 吴慎杰 郝曜山 董艳辉（98）

参薯*WRKY*基因家族鉴定及其在线虫胁迫响应及激素信号调控中的作用
…… 王明珠 孙林涛 常英英 张江利 高锦 王瑞飞 张昊 李明军 杨清香（108）

亚麻荠*CsFAD*基因家族鉴定及α-亚麻酸合成关键基因*CsFAD3.3*的功能分析
…… 高慧玲 贾峥嵘 薛金爱 宋亚楠 贾小云 李润植（122）

转录因子GhWRKY21调控棉花耐高温机制研究…… 王佳玉 王琛（134）

葡萄苹果酸脱氢酶*MDH*基因家族鉴定及*VvMDH10*基因功能分析…… 高亮 崔鑫源 刘名原 韩蕾（142）

过表达葡萄*VaHY5*基因增强拟南芥低温胁迫耐受性…… 薛孟孟 耿艺轩 韩煦乐 杨始锦（153）

草莓*FaJAZ5*基因的克隆及其对盐胁迫的响应
…… 黄姗 陈言 李桐 林邦语 梁玉梦 苟倩 林源秀 汤浩茹 张云婷（160）

森林草莓*FveTCP5*基因在盐胁迫中的功能分析
…… 董向向 缪百灵 陈娟娟 张坤鹏 李亮杰 周厚成 朱庆松（169）

不同转化方法介导高温胁迫下枇杷果实*EjHSFB-2a*过表达效率比较
…… 牛洁 汪红霞 任艺华 易鹏翰 周佳 孟鹏蕊 邓群仙 张慧芬（177）
甜瓜*CmPOD*基因家族鉴定及叶组织响应低温胁迫的表达分析
…… 梁智伦 漆思庆 李欣洋 梁健浩 刘骕骝（188）
*CmoNST1*基因C端截短导致南瓜裸仁表型 …… 申琼 刘亚楠 孟洪玉（198）
钙调素结合蛋白StIQD20介导马铃薯耐盐性的功能研究
…… 冯瑞云 李京昊 王紫腾 宋宇鹏 侯雅静 段永红 宋倩娜 梅超（207）
九种金丝桃属植物叶绿体全基因组:基因组结构、比较分析和系统发育关系
…… 范照睿 王佳敏 童凯 康振辉（216）
杂交兰*ChChlH*基因的克隆及其表达分析…… 林榕燕 孔兰 吴建设 林兵 钟淮钦（229）
丹参*RBOH*基因家族特征及盐胁迫响应分析
…… 李贺勤 闫恒宇 袁语锌 段炎炎 李彩丽 单成钢 江绪文（238）
山西省伞菌目3个中国新记录种…… 张前达 马晓庆 刘晋涛 常明昌 孟俊龙 王术荣（250）
丛枝菌根真菌共生对黄芪幼苗促生机理研究
…… 刘红军 张胜 杨卫平 卢庚龙 白雨果 李婉迪 牛景萍 梁建萍 石志勇（257）
加拿大一枝黄花病原菌鉴定及其复配制剂的生防效果
…… 靳文涛 李迎新 杨绍红 刘应高 翟森 蒋平 宋雷 李姝江（269）
基于改进YOLOv8的绿豆叶片主要病害检测研究
…… 王超 杨钰超 郭思宇 贾瑶镞 陈艳霞 赵钰 乔星星 肖璐洁 冯美臣 杨武德（282）
功能膜覆盖下羊粪堆肥促腐效果及碳氮素转化的微生物机制…… 李荣荣 蔡瑞（293）
动态调控小热休克蛋白表达以提升大肠杆菌耐热性并高效生产L-乳酸
…… 梁浩 黄恩园 朱丽雯 赵锦芳 刘晓楠 王永泽（305）
基于P450scc系统的酿酒酵母从头合成孕烯醇酮细胞工厂的构建与优化
…… 董旭芳 童颖佳 刘伟 史劲松 许正宏 李会（317）
猪δ冠状病毒核衣壳蛋白稳转细胞株的构建及其功能探究
…… 杨泰然 郑鑫祺 胡超 安婷婷 文龙 李有利 陈峥宏 崔古贞 李博岩 田益明（328）

（本期值班编辑 张婷婷）

北大中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库（CSCD核心）、RCCSE中国核心学术期刊（A），EI、SCOPUS、CAB Abstracts、美国化学文摘（CA）、中国精品科技期刊、百种中国杰出学术期刊、中国科技期刊卓越行动计划——中文领军期刊

BIOTECHNOLOGY BULLETIN
October **26**, **2026** Vol.**42** No. **10** (Serial No. **411**)

CONTENTS

Plant Regeneration and Genetic Transformation: From Empirical Exploration to Rational Design
…… ZHANG Wan-yu XING Jun-qiang SUN Qin-fu WANG You-ping (1)

Research Progress in the Mechanism of Carotenoids Regulating Plant Flower Color and Fruit Color
…… LI Fu-wei LI Hong-yu (13)

Development and Application of Insertion-deletion (InDel) Markers in Tomato Based on Whole-genome Re-sequencing Data
…… SU Xiao-mei LIU Shu-mei LYU Hong-jun et al (27)

Construction and Optimization of Corncob Fermentation Process Using Composite Microbial Inoculum
…… CHEN Wen-yan ZHOU Rui WU Hui-hao et al (37)

Synthesis of Circular Full-length Human Mitochondrial DNA Based on Yeast Cloning and Staggered Thermal Cycling Ligation
…… PENG Wen-hui LI Guan-chu LIU Yong-min et al (47)

Identification of Heat-responsive Co-expression Modules and Mining of Hub Genes in Maize Tassel Based on WGCNA
…… QIN Tian-yuan LYU Yu-ping ABULAITI Abula et al (55)

Bioinformatic and Expression Analysis of the *SiGeBP* Gene Family in *Setaria italica*
…… CAO Hai-yan ZHANG Zi-tong MENG Zi-yu et al (67)

Cloning of the Saline-alkali Response Gene *AsGolS2* and Screening of Interacting Proteins in Oat
…… SUN Jin-liang LI Xing-yan ZHANG Bi-ru et al (77)

Cloning and Functional Characterization of the Lysophosphatidic Acid Acyltransferase Gene *AsLPAAT5* in *Avena sativa*
…… HU Rong-fang DING Jia-hao MA Ju-hua et al (88)

Identification of *G6PDH* Gene Family in *Chenopodium quinoa* and Functional Analysis of *CqG6PDH1* in Salt Tolerance
…… WANG Yi-xue LIU Jia-hui XU Fan et al (98)

Role of the *WRKY* Gene Family in *Dioscorea alata* L. in Response to Nematode Stress Response and Hormonal Signal Regulation
…… WANG Ming-zhu SUN Lin-tao CHANG Ying-ying et al (108)

Genome-wide Identification of the *CsFAD* Gene Family in *Camelina sativa* and Functional Characterization of the Key Gene *CsFAD3.3* Involved in α-linolenic Acid Biosynthesis
…… GAO Hui-ling JIA Zheng-rong XUE Jin-ai et al (122)

Mechanism of GhWRKY21 Transcription Factor in Regulating Cotton High Temperature Resistance
…… WANG Jia-yu WANG Chen (134)

Identification of Malate Dehydrogenase *MDH* Gene Family and Functional Characterization of *VvMDH10* in Grape
…… GAO Liang CUI Xin-yuan LIU Ming-yuan HAN Lei (142)

Overexpression of *VaHY5* Gene from *Vitis amurensis* Enhances Tolerance to Cold Stress in *Arabidopsis thaliana*
…… XUE Meng-meng GENG Yi-xuan HAN Xu-le YANG Shi-jin (153)

BIOTECHNOLOGY BULLETIN
October **26**, **2026** Vol.**42** No. **10** (Serial No. **411**)

Cloning of Strawberry *FaJAZ5* Gene and Its Response to Salt Stress
…… HUANG Shan CHEN Yan LI Tong et al (160)

Functional Analysis of *FveTCP5* Gene in *Fragaria vesca* under Salt Stress
…… DONG Xiang-xiang MIAO Bai-ling CHEN Juan-juan et al (169)

Comparison of the Efficiency of Different Transformation Methods for Mediating *EjHSFB-2a* Overexpression in Loquat Fruit under High-temperature Stress
…… NIU Jie WANG Hong-xia REN Yi-hua et al (177)

Identification of the *CmPOD* Gene Family in Melon and Expression Analysis of Leaf Tissues under Low-temperature Stress
…… LIANG Zhi-lun QI Si-qing LI Xin-yang et al (188)

C-terminal Truncation of *CmoNST1* Leads to Hull-less Seeds in *Cucurbita moschata* Duch.
…… SHEN Qiong LIU Ya-nan MENG Hong-yu (198)

Functional Study of the Calmodulin-binding Protein StIQD20 in Mediating Salt Tolerance in Potato
…… FENG Rui-yun LI Jing-hao WANG Zi-teng et al (207)

Chloroplast Whole Genomes of Nine *Hypericum* Species: Genome Structure, Comparative Analysis, and Phylogenetic Relationships
…… FAN Zhao-rui WANG Jia-min TONG Kai KANG Zhen-hui (216)

Cloning and Expression Analysis of *ChChlH* Gene in *Cymbidium* hybrid
…… LIN Rong-yan KONG Lan WU Jian-she et al (229)

Characterization of the *RBOH* Gene Family and Analysis of Its Salt Stress Responses in *Salvia miltiorrhiza*
…… LI He-qin YAN Heng-yu YUAN Yu-xin et al (238)

Three New Chinese Records of Agaricales Species from Shanxi Province, China
…… ZHANG Qian-da MA Xiao-qing LIU Jin-tao et al (250)

Mechanisms of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Symbiosis in Promoting Growth of Astragalus Seedlings
…… LIU Hong-jun ZHANG sheng YANG Wei-ping et al (257)

Pathogen Identification and Its Compound Formulations' Control Efficacy against *Solidago canadensis*
…… JIN Wen-tao LI Ying-xin YANG Shao-hong et al (269)

Research on Detection of Major Diseases in Mung Bean Leaves Based on an Improved YOLOv8
…… WANG Chao YANG Yu-chao GUO Si-yu et al (282)

Microbial Mechanisms of Promoting Humification and Carbon-Nitrogen Transformation of Sheep Manure Composting under Functional Membrane Covering
…… LI Rong-rong CAI Rui (293)

Enhancing *E. coli* Thermotolerance via Dynamic Control of Small Heat Shock Protein Expression for Efficient L-lactate Production
…… LIANG Hao HUANG En-yuan ZHU Li-wen et al (305)

Construction and Optimization of *de novo* Pregnenolone Cell Factory Based on the P450scc System in *Saccharomyces cerevisiae*
…… DONG Xu-fang TONG Ying-jia LIU Wei et al (317)

Construction and Functional Characterization of Stable Cell Lines Expressing Nucleocapsid Protein of Porcine Deltacoronavirus
…… YANG Tai-ran ZHENG Xin-qi HU Chao et al (328)

生物技术通报
· 综述与专论 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):1-12

植物再生与遗传转化技术:从经验摸索到理性设计

张婉钰 邢俊强 孙勤富 王幼平*
(扬州大学生物科学与技术学院,扬州 225000)

摘 要: 植物再生与遗传转化技术是植物生物技术和精准育种的基础。然而,其应用长期受到“基因型依赖性”和“再生效率低下”问题的困扰,严重限制了其在多数作物(尤其是难转化种质)中的广泛应用。近年来,随着植物发育生物学、表观遗传学、合成生物学等领域的深入发展与交叉融合,植物再生与遗传转化正经历从“经验依赖”到基于分子机制的“理性设计”的范式转变,为解决上述问题提供了关键突破口。本综述系统梳理并深入剖析了四大核心领域的最新进展:一是发育调控因子的工程化应用,特别是GRF-GIF嵌合体系统的发现与普适性验证;二是表观遗传调控网络的机制解析与化学干预策略;三是基因递送系统的创新与多路径突破;四是不依赖组织培养的“原位转化”技术的兴起与发展。这些进展相互协同,共同构成了一个强大的技术体系,正逐步打破基因型依赖的壁垒,为全球作物改良与功能基因组学研究开启新篇章。

关键词: 植物再生;遗传转化;GRF-GIF;表观遗传调控;三元载体系统;原位转化
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1380

Plant Regeneration and Genetic Transformation: From Empirical Exploration to Rational Design

ZHANG Wan-yu XING Jun-qiang SUN Qin-fu WANG You-ping*
(*College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou* 225000)

Abstract: Plant regeneration and genetic transformation are fundamental to plant biotechnology and precision breeding. However, their application across diverse crops has long been hindered by the persistent challenges of “genotype dependency” and “low regeneration efficiency”, which severely limit their broad utility, especially in recalcitrant germplasms. In recent years, with the deepening development and interdisciplinary convergence of fields such as plant developmental biology, epigenetics, and synthetic biology, the field of plant regeneration and transformation is undergoing a paradigm shift from “experience-dependent” practice to “mechanism-based rational design”. This shift is enabling critical breakthroughs to address these bottlenecks. This review systematically outlines and critically analyzes the latest advancements in four core areas: first, the engineered application of developmental regulators, particularly the discovery and universal validation of the GRF-GIF chimeric system; second, the mechanistic elucidation of epigenetic regulatory networks and corresponding chemical intervention strategies; third, innovations and multipronged breakthroughs in gene delivery systems; and fourth, the emergence and development of tissue culture-independent *in planta* transformation technologies. These synergistic advances collectively constitute a powerful toolbox that is progressively dismantling the barriers of genotype dependency, thereby opening new chapters for global crop improvement and functional genomics research.

Keywords: plant regeneration; genetic transformation; GRF-GIF; epigenetic regulation; ternary vector system; *in planta* transformation

植物细胞的全能性(totipotency)即单个体细胞发育为完整植株的潜能,是植物再生技术的理论基础。自20世纪80年代首例转基因植物问世以来,农杆菌介导的遗传转化和基因枪轰击等技术已成为植物生物学研究与作物育种的核心手段。然而,经过近半个世纪的技术积累,仍存在一个根本性难题:

收稿日期:2025-12-17
基金项目:国家自然科学基金项目(U24A20398,W2412098)
*通信作者:王幼平 wangyp@yzu.edu.cn

对绝大多数作物品种及其野生近缘种而言，建立高效、稳定的遗传转化和再生体系仍极具挑战[1]。这种“难转化性”（recalcitrance）不仅严重阻碍了功能基因验证与性状快速改良，更成为基因组编辑技术在作物中规模化应用的最大瓶颈。

针对植物再生与转化效率低下的问题，传统主要依赖经验性的培养基优化策略，包括调整植物生长调节剂（如生长素和细胞分裂素）的种类、浓度与配比，尝试不同的外植体（如胚、茎段、叶片）以及优化培养条件（光照、温度）[2]。这类方法本质属于“试错”，成功率高度依赖于操作者的经验与植物本身的特性。尽管通过优化农杆菌侵染方法、外植体类型与植物生长调节剂组合，已在黑果枸杞（*Lycium ruthenicum* Murr.）与楸树（*Catalpa bungei* C.A.Mey）等物种中将遗传转化效率提升至90%以上[3-4]，但对于禾谷类、林木及豆科等重要经济作物，此类经验性优化手段往往效果有限。

近年来，植物发育生物学、表观遗传学、合成生物学及单细胞组学等领域的高速发展与交叉融合，使研究者得以深入解析植物分生组织维持、器官发生和体细胞胚诱导的关键调控网络。基于这些基础研究成果，科研人员开始突破传统的激素调控框架，通过主动干预甚至“重编程”细胞的发育命运，从根本上克服植物固有的再生限制[5]，这标志着该领域正式迈入从经验摸索向理性设计转型的新阶段。例如，过表达BABY BOOM（BBM）、WUSCHEL（WUS）等发育调控因子，可显著增强植物的再生与转化效率[6-7]；将纳米载体、两性微针等新型递送系统与优化的三元载体系统结合，可实现外源基因或基因编辑工具高效无创伤递送[8-9]。这些技术相互关联、协同增效，共同构建了一套全新的技术体系，为打破基因型依赖、提升再生效率奠定了坚实的技术基础。

现代植物再生与遗传转化的核心路径可概括为以下4个关键环节（图1）：首先，通过农杆菌介导、纳米颗粒递送等多样化的基因递送系统将外源遗传物质导入植物细胞；其次，利用RUBY、荧光蛋白等可视化标记系统快速鉴定转化或编辑事件；同时，借助以GRF-GIF为代表的发育调控因子增强细胞重编程与再生能力；最终，通过组织培养依赖或非依赖的方式实现植物的高效、稳定遗传转化与植株再生。上述技术框架整合了本文梳理的关键技术模块及其协同作用，为后续各部分的深入阐述提供整体思路。

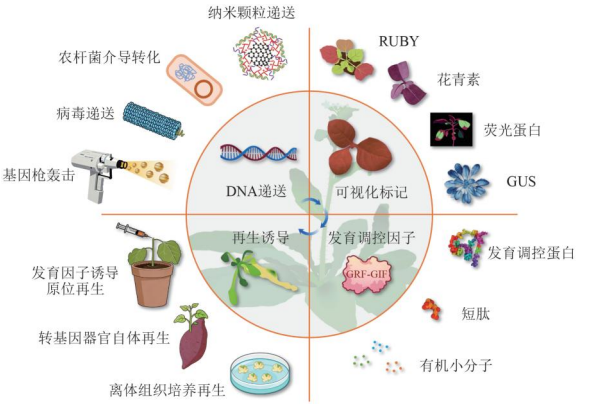


图1 植物再生与遗传转化的关键技术组件示意图

Fig. 1 Schematic diagram of key technological components for plant regeneration and genetic transformation

1 基因递送系统的创新

将外源基因高效、完整地递送到植物细胞内是遗传转化的第一步，也是决定转化效率的关键环节。近年来，传统递送技术得到了显著优化，一系列新型递送技术也不断涌现，为解决不同物种的转化难题提供了多样化选择。目前常用的基因递送方法包括农杆菌介导转化、基因枪轰击法、纳米载体递送和病毒载体递送（表1）。

1.1 农杆菌介导转化方法的深度优化

根瘤农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）介导的遗传转化技术，因其能实现大片段的DNA转移，且整合的外源基因通常拷贝数较低，仍是目前植物遗传转化的首选方法。最近报道的三元载体系统是对传统双元载体系统的重大升级。该系统在传统双元系统（含T-DNA载体和辅助质粒）基础上，引入了第3个携带额外毒力（*vir*）基因（如来自高毒力菌株的*virG*、*virB*、*virE*等）的辅助质粒，这些额外的Vir蛋白能显著提升T-DNA的加工和递送效率[10]。研究证实，使用三元载体系统可使玉米、高粱等难转化作物的稳定转化效率提高1.5-21.5倍，极大地扩展了农杆菌的宿主范围[9, 11]。

抑制农杆菌过度生长是提高遗传转化中外植体

表1　植物遗传转化主要递送系统对比

Table 1　Comparison of major delivery systems for plant genetic transformation

递送系统 Delivery system	主要原理 Principal mechanism	核心优点 Key advantages	主要局限/挑战 Major limitations/ Challenges	典型适用场景 Typical applications
农杆菌介导	利用细菌天然机制将T-DNA整合至植物基因组	整合拷贝数低； 可转移大片段； 技术成熟、操作简便、成本较低	存在宿主偏好性，对部分单子叶及难转化物种效率低	多数双子叶及部分单子叶植物的稳定转化
基因枪轰击	通过高压气体将包裹DNA的金属微粒（金/钨）直接轰击入植物细胞或细胞器	几乎不受物种、基因型限制； 可递送多种形态物质； 能高效转化叶绿体和线粒体	整合拷贝数多且随机，易导致基因沉默或表达不稳定； 设备成本较高； 条件优化复杂； 可能造成组织物理损伤	小麦、水稻等单子叶作物的遗传转化； 细胞器转化
纳米载体递送	利用纳米材料（如碳纳米管、脂质体）包裹核酸，通过物理或化学作用穿透细胞壁和细胞膜递送基因	潜力上可适用于任何物种； 可递送核蛋白复合体，避免DNA整合； 避免核酸胞内降解，转化效率高	技术不成熟，缺乏标准化流程； 纳米材料的环境影响尚不明确	CRISPR/Cas9等基因编辑工具的递送； 难转化物种（如林木、藻类）的遗传工程
病毒载体递送	利用改造后的植物病毒在体内移动和复制	快速产生大量目标蛋白，无需基因组整合； 不依赖组织培养	承载容量小； 通常不整合入基因组，外源基因无法稳定遗传； 存在生物安全风险	基因功能快速验证； 植物生物反应器生产药用蛋白； 基因编辑

存活率的有效策略。例如，利用胸腺嘧啶营养缺陷型菌株（如EHA105Thy-）侵染外植体后，在缺乏胸腺嘧啶的培养基中培养可阻止农杆菌过度增殖，从而简化除菌步骤并提高外植体存活率，且该改造不会影响农杆菌的T-DNA递送能力[9]。

对于对根瘤农杆菌不敏感的植物物种，发根农杆菌（*Agrobacterium rhizogenes*）提供了有效替代方案。该系统已成功用于诱导马铃薯近缘种的转基因毛状根，并最终实现基因编辑植株的再生[12]。在黄瓜、西瓜等作物中也建立了毛状根转化体系，可用于CRISPR构建体的快速验证和转化材料的快速获得[13]。

1.2　基因枪（微弹轰击）法的革新

基因枪法通过高速微粒轰击将外源DNA导入植物细胞，具有操作简便、受植物物种和基因型影响小的特点，是植物遗传转化常用技术之一。通过优化外植体前处理条件、轰击次数、压力和距离等参数，可显著提升转化效率，如在白菜小孢子转化中，经参数优化后转化率最高可达10.82%[14]。

尽管基因枪法已应用数十年，但其转化效率低、结果一致性差的问题仍长期存在。近期研究发现，传统基因枪递送效率很大程度上受限于气体与颗粒流的物理障碍。针对该问题，研究者通过优化“枪管”设计，开发出新型导向枪管，显著提高了外源基因的递送效率[15]。该优化方案在多种作物中得到验证，如在洋葱表皮中瞬时转染效率提升22倍，玉米幼胚的稳定转化频率提升10倍以上，小麦茎尖分生组织中CRISPR系统介导的基因编辑效率实现翻倍[16]，同时还实现了不依赖组织培养的稳定遗传转化，进一步提高了该技术的应用价值。

1.3　纳米材料递送技术与应用前景

纳米技术的发展为植物遗传转化开辟了不依赖生物载体、可跨越物种障碍的新路径。通过设计如介孔二氧化硅纳米颗粒（MSNs）、脂质纳米粒（LNPs）以及阳离子修饰的纤维素纳米晶体CNC和玉米醇溶蛋白Zein等植物源生物聚合物纳米晶体，可将DNA、RNA或蛋白质复合物（如Cas9/sgRNA核糖核蛋白复合体）高效包裹并递送进入植物细胞。这些纳米材料能保护核酸免于降解，并通过物理方

法（如叶片注射或真空渗透）辅助其穿越细胞壁，借助内吞等途径实现胞内递送与外源基因的瞬时表达[17]。目前，纳米材料递送技术主要应用于瞬时表达或基因编辑研究，在实现稳定遗传转化方面仍需进一步探索，但其在递送CRISPR核糖核蛋白复合体实现高效、低脱靶基因编辑方面已展现出巨大潜力。

近期，更多创新性递送平台的出现进一步推动了该领域的发展。例如，基于天冬氨酸修饰的聚合物胶束（Asp/PDPA-NP）等仿生型纳米载体，能利用植物内源的氨基酸转运蛋白实现外源物质的快速、跨物种胞内递送，可在10 min内将物质（如植物激素ABA）送入细胞，已在作物抗旱改良中展现出应用价值[8]。此外，物理装置型递送系统也取得重要突破，如适用于水陆环境的两栖微针（amphibious microneedles），其独特的核–壳结构可在不同环境中实现核酸、蛋白质、活性农杆菌等货物的可控释放，为复杂环境下的植物工程提供了通用工具[18]。

1.4 病毒载体递送系统的发展与应用

植物病毒载体是一种利用改造后的病毒基因组递送外源基因的工具，具有表达快速高效、通常无需组织培养的特点，在基因功能研究和生物技术应用中占有独特地位。其核心原理是将外源基因序列插入病毒基因组的非必需区域，构建重组病毒感染性克隆，通过机械接种等方式导入植物，利用病毒自身的复制和移动能力实现外源基因的高水平表达。自1980年Howell等[19]首次证实克隆的花椰菜花叶病毒（CaMV）DNA具有感染性，以及1984年Brisson等[20]利用该病毒载体在植物中表达细菌基因以来，植物病毒载体正式成为植物遗传工程的重要工具。

历经数十年发展，植物病毒载体的设计和应用日趋精细化、多元化。为克服病毒基因组承载容量小、外源基因不稳定的局限，研究者开发了双启动子、自切割多肽融合以及双组分体内重组（如magnICON系统）等多种策略[21]；同时，病毒载体的应用场景也从早期的蛋白表达和基因沉默，逐步拓展至基因编辑工具的递送。例如，Weiss等[22]对烟草脆裂病毒（TRV）进行改造，将紧凑型基因编辑系统TnpB-ISYmu1递送至拟南芥中，实现了无需组织培养、可遗传的“一步法”基因编辑，在突破传统递送技术瓶颈方面展现出巨大潜力。基于马铃薯Y病毒（PVY）和辣椒脉斑驳病毒（PVMV）构建的载体系统可同时高效表达2个外源蛋白，大幅提升了基因功能研究的效率[23]。

总体而言，病毒载体递送技术具有外源基因表达快速高效、宿主范围相对广泛且通常不依赖组织培养等显著优势。但该技术也存在明显局限，如外源基因承载容量有限、通常无法稳定遗传，同时存在潜在的生物安全风险。未来，通过将病毒载体与纳米材料等新兴递送系统联用，并通过删除致病基因、拆分功能模块等方式加强生物安全设计，有望使植物病毒载体在作物精准改良和合成生物学中发挥更关键的作用。

除上述递送系统外，原生质体转化法也是一类重要的植物遗传转化技术，在特定场景中发挥重要作用。该技术通过酶解法去除植物细胞壁获得原生质体，随后利用聚乙二醇（PEG）介导的化学转化、电穿孔或脂质体包裹等方法将外源DNA导入细胞[24]。原生质体转化具有细胞均一性好、转化效率高、可进行瞬时表达与稳定转化等优点。在CRISPR介导的基因编辑中，可直接向原生质体递送RNP复合物，实现无外源DNA整合的编辑，展现出独特的技术优势[25]。目前，原生质体转化技术已在水稻、拟南芥、烟草及多种药用植物中成功应用，成为基因功能研究、基因组编辑及合成生物学调控元件筛选的重要平台。但原生质体转化也存在明显局限：其应用高度依赖成熟的原生质体制备与植株再生体系，整体操作流程复杂、实验周期较长，且部分物种至今仍难以实现原生质体的高效再生，成为该技术规模化应用的主要瓶颈。

2 发育调控因子的工程化应用

向细胞内导入核心再生转录因子，人为诱导细胞“重编程”并重塑细胞命运，是克服植物再生障碍的有效技术路径。BBM、WUS、GRF等发育调控因子的工程化应用取得了系列突破，其中GRF与其互作因子GIF构成的嵌合蛋白最具代表性[6]。

2.1 GRF-GIF系统的机制解析与应用

GRF是植物特有的一类转录因子，广泛存在于各类陆生植物类群中。在叶片、花器官的组织中，GRF可以与转录共激活因子GIF互作形成转录调控

复合物，在分生组织特性（meristematic specification）维持中发挥功能[26]。2020年Kong等[27]研究证明异源表达拟南芥*AtGRF5*基因可以显著提高甜菜、油菜、向日葵、大豆及玉米的再生或遗传转化效率。随后，Debernardi等[6]将小麦*TaGRF4*和*TaGIF1*基因的编码区通过一段柔性linker融合为单一嵌合基因*TaGRF4-GIF1*，过表达该基因能显著提升小麦、小黑麦和水稻的再生效率，缩短再生时间，并扩大可转化基因型的范围，标志着GRF-GIF嵌合蛋白工程化应用正式开始。目前，该策略已在多种重要作物得到广泛验证，展现出优异的再生增强效果（表2）。

表2　GRF-GIF嵌合体在植物再生与遗传转化中的应用效果

Table 2　Application performance of GRF-GIF chimeras in plant regeneration and genetic transformation

嵌合体 Chimera	转化物种 Transformed species	外植体类型 Explant type	效果 Performance	参考文献 Reference
TaGRF4-GIF1	小麦、水稻、柑橘	幼胚、愈伤组织	显著提高再生效率，缩短再生时间，提高可转化基因型数量	[6]
TaGRF4-GIF1	小麦、大麦	幼胚	促进再生，但大麦中抑制再生，需优化表达	[38]
TaGRF4-GIF1 ZmGRF1-GIF1	玉米	幼胚	与三元载体系统结合，小麦来源与玉米来源的GRF-GIF均大幅提高再生转化频率	[11]
TaGRF4-OsGIF1	高粱	幼胚	与三元载体系统结合，转化效率达38.28%，为原始方法的7.71倍，转化流程缩短	[28]
TaGRF4-GIF1 DcGRF4-GIF1	铁皮石斛	叶片、茎段	显著提高植株再生效率	[29]
GRF5	甜菜、油菜、大豆、向日葵、玉米	愈伤组织、幼胚	提高再生与转化效率，克服基因型依赖性	[27]
ClGRF4-GIF1	西瓜	子叶、下胚轴	转化效率最高达67.27%，实现基因型非依赖性转化	[32]
SlGRF4c-GIF1a	番茄	愈伤组织	显著提高再生效率，缩短再生周期约1个月	[31]
TaGRF4-TaGIF1 VvGRF4-VvGIF1 CcGRF4-GIF1	二倍体野生草莓	叶片	三种来源的嵌合体均显著提高再生效率	[34]
AtGRF5	黄瓜、甜瓜、西瓜	子叶、愈伤组织	促进愈伤增殖与干细胞扩增，提高转化效率	[39]
GmGRF3-GIF1	大豆	子叶节	显著提高再生与转化效率，扩大可转化品种范围	[30]
AcGRF4-AcGIF1	猕猴桃	叶片、下胚轴、顶芽；叶柄	显著提高发根农杆菌介导的毛状根诱导率和再生效率	[35]
BoGRF4-GIF-BoGRF4 BoGRF5-GIF-BoGRF5	甘蓝	子叶、下胚轴	均显著提高再生效率，BoGRF5-GIF-BoGRF5效果更强，再生效率提高55.2%	[37]
GRF4-GIF1	莴苣	子叶	显著提升多个栽培及野生种的体外再生效率和不定芽发生频率	[33]
CpGRF4-CpGIF1	柑橘	上胚轴	植物再生率达44.17%，为空载对照的3倍	[36]

在玉米中，结合三元载体系统，*ZmGRF1-ZmGIF1*嵌合体可使自交系B104的转化效率提升3.5–6.5倍[11]；单独表达内源*GRF5*或来源于小麦的*TaGRF4-GIF1*同样能提升玉米转化效率[27]。在高粱中，*GRF4-GIF1*嵌合体和三元载体系统联用，成功建立了快速高效的遗传转化及基因编辑平台[28]。在铁皮石斛（*Dendrobium catenatum*）中，来源于小麦的*TaGRF4-GIF1*和内源*DcGRF4-GIF1*均可显著提高植株叶片和茎段的再生效率[29]。值得注意的是，*TaGRF4-GIF1*可在无外源细胞分裂素的条件下诱导小麦高效再生，为开发无选择标记的植物转化系统提供了新可能[6]。

在双子叶植物中，GRF-GIF嵌合体同样能发挥高效的再生调控作用。*GmGRF3-GIF1*嵌合体可以提高大豆遗传转化与基因编辑效率[30]；SlGRF-GIF可使番茄组织培养时芽再生时间提前约1个月，并将

转基因效率加倍[31]。在西瓜中，表达microRNA396（miR396）靶位点突变的*ClGRF4-GIF1*嵌合体实现了高达67.27%的转化效率，且突破了基因型限制[32]。该系统在莴苣[33]、草莓[34]、猕猴桃[35]和柑橘[6, 36]等多种作物中均表现出强大的再生增强效应。在甘蓝中，研究者设计了*BoGRF5-GIF-BoGRF5*嵌合体，以子叶和下胚轴为外植体进行遗传转化时，可将甘蓝转化效率提高55%[37]。

*GRF*是miR396的下游靶标基因，其基因表达受到miR396转录后抑制[40]。因此，将*GRF*基因的miR396结合位点处序列进行点突变以避免其功能切割；或在细胞中表达靶标模拟物（MIM396）抑制miR396的功能，可以通过升高细胞中GRF-GIF蛋白含量加强其促进再生的效果[29]，但GRF-GIF蛋白含量升高过多又会危害植株的正常发育[34]。蛋白结构的研究进一步确定了GRF-GIF复合体协同工作的原理：GRF单独表达时，其DNA结合结构域的活性受抑制；而GRF和GIF结合后，其DNA结合结构域开放，实现高效的转录上调[41]。GRF-GIF嵌合蛋白可以跨物种发挥功能，但会受到供体植物和受体植物间亲缘关系的影响。如在草莓中，来源于葡萄、小麦和柑橘的*GRF4-GIF1*均可提高草莓再生效率，而葡萄来源的*VvGRF4-GIF1*的效果最好，且不会产生异常表型[34]。

系统进化分析发现GRF和GIF蛋白家族在陆地植物中广泛存在，并存在成员多样化现象。两者间的蛋白相互作用早在蕨类植物中就有体现，并在不同植物亚门中也普遍保守[42]。这种进化上的保守性是GRF-GIF系统跨物种发挥作用，成为再生诱导的普适性工具的分子基础。以上结果说明，在应用GRF-GIF时需注意其物种来源及表达情况，实现再生效率与植株正常发育之间的平衡。

2.2 其他关键发育调控因子的功能与应用

除GRF-GIF外，许多在胚胎发生和分生组织维持中发挥核心调控作用的转录因子在植物再生诱导中也展现出巨大潜力[43]。例如，在木兰科木本植物鹅掌楸（*Liriodendron hybrid*）中过表达*LhBBM*基因能显著促进体细胞胚胎发生并提高遗传转化效率[7]。在拟南芥和辣椒中，通过协同应用根干细胞微环境（root stem cell niche）的关键因子（如RBR、SCR、SHR、AIL/PLT和WOX家族成员），可在不依赖外源植物激素的情况下诱导体细胞胚胎再生[5]。在芜菁和白菜中共表达发育调节因子ZmWUS2-IPT-AtPLT5，可实现高效再生及转化[44-45]；玉米ZmH-SCF1通过促进胚胎愈伤组织增殖而显著提高农杆菌介导的转化效率[46]。

GRF-GIF可与其他再生调节因子协同发挥功能。例如拟南芥GRF-GIF与AINTEGUMENTA（ANT）可以协同促进侧生器官的分生能力[47]，GRF-GIF-BBM组合也已被用于提高难转化植物再生效率[48]。这些结果表明，通过合理搭配不同的调控因子，有望在不同植物中实现更精准、更高效的再生调控。

2.3 多肽及小分子化合物在植物再生中的调控作用

多肽类信号分子正日益成为优化植物再生效率的重要调控工具。近年来研究发现，多种植物内源多肽在组织培养过程中参与再生调控。分泌型多肽RGF家族成员RGF3、RGF8[49]以及PIP家族成员PIP1、PIPL3[50]，可通过RGI或RLK7受体激活下游SERK-MKK-MAPK级联，稳定PLT等核心多能性蛋白，增强愈伤组织的芽再生能力。REF1作为不依赖于系统素的局部创伤信号多肽，被其受体激酶PORK1识别后，激活下游MAPK信号通路并上调*WIND1*等核心转录因子的表达，进而激活*ESR1*等基因启动细胞重编程[51-52]，活化的WIND1可进一步促进REF1前体基因的表达，实现损伤部位再生信号的放大与稳定。

在实践中，可以外源施加人工合成的多肽提升再生与转化效率。在拟南芥、番茄、水稻组织培养时加入PIPL3，外植体再生效率提高1.4–2.8倍[53]；在番茄、大豆、小麦、辣椒和玉米等作物中，添加REF1多肽可将再生与转化效率提升数倍至数十倍[51, 54]，与使用再生调控蛋白的策略形成有效互补。除多肽外，多种小分子化合物也在植物再生和遗传转化中发挥重要调控作用。细胞分裂素类似物thidiazuron（TDZ）[55]、广谱性再生激活剂ferric pyrophosphate X（FPX）[56]、抗氧化剂glutathione（GSH）[57]和ascorbic acid（ASC）[58]等，均可通过不同机制提升植物再生效率。

研究发现，原本开发用于治疗阿尔茨海默病等人类疾病的GSK-3β抑制剂TDZD-8，在甘蓝型油菜、

大麦等作物和林木植物栓皮栎中，可显著促进微孢子胚胎发生和体细胞胚胎发生[59]。其作用机制主要是上调*FUS3*、*LEC2*等胚胎发生关键基因及*TAA1*等生长素合成基因的表达，并动态调控油菜素内酯通路，从而高效促进植物胚胎发生。HIR99021、BIO、LiCl等其他结构的GSK-3β抑制剂也可能具备类似的跨界活性，有望为植物再生调控提供全新的化学遗传学工具箱。

3　植物再生的表观遗传调控

植物再生是已分化细胞通过重编程获得多能性或全能性的动态过程，该过程的有序进行依赖多层次的调控机制。其中，DNA甲基化、染色质可及性变化和microRNA介导的调控等表观遗传机制，共同构成一个精细的调控网络，在植物再生的细胞命运转变中发挥关键作用[60]。

3.1　小分子化合物介导的表观遗传调控

借助小分子化合物调控细胞组蛋白修饰从而提升植物再生效率是一种简便高效的思路。目前最有效的表观遗传调控分子主要包含DNA甲基转移酶抑制剂和组蛋白去乙酰化酶抑制剂两类。如DNA甲基转移酶抑制剂氮杂胞苷（Aza）能够加快桃（*Prunus persica*）愈伤组织的生长，而H3K27me3去甲基化酶抑制剂GSK-J4会阻碍愈伤组织生成，证实DNA低甲基化状态及H3K27me3去甲基化程度在植物再生中发挥重要调控功能[61]。在生菜（*Lactuca sativa* L.）和本氏烟（*Nicotiana benthamiana*）原生质体的培养过程中，向培养基内加入组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素A（TSA）或丁酸钠（NaB）后，细胞分裂率会提高20%以上，加速愈伤组织的增殖[62]；TSA通过提高组蛋白H3乙酰化程度，上调*CDK*、*CYCD3-1*等细胞周期相关基因和*WUS*的表达。5-氮杂胞苷（5-azaC）能够降低黑刺槐（*Robinia pseudo-acacia* L.）的全基因组DNA甲基化水平，激活以Rp-MYB2为主的转录网络，改善不定根的再生能力[63]。BIX-01294通过抑制H3K9me2水平和DNA甲基化，促进甘蓝型油菜和大麦小孢子培养早期的重编程、全能性获得及胚状体形成[64]。这些研究结果表明，表观遗传化学调节方法可以在一定程度上普遍应用于各类植物，提升其再生效率。

3.2　内源表观遗传因子在再生中的核心作用

内源性表观遗传因子本身是再生调控网络的核心组件[65]。在拟南芥中，组蛋白甲基转移酶ATX4通过对*STM*等芽分生组织关键基因进行H3K4me3修饰，调控芽再生过程[66]；PRC2复合物（催化H3K27me3）[67]、组蛋白乙酰转移酶（HATs）[68]、去乙酰化酶（HDACs）[69]等表观遗传因子，通过调控H3K27me3的去沉积、H3乙酰化水平的升降，精确控制*WUS*、*LEC*等再生相关转录因子的时空表达。这些研究充分表明，表观遗传重编程是植物再生过程中细胞命运转变的必需环节。

3.3　等位基因与细胞区室水平的表观调控

当前，植物再生的表观遗传调控研究正朝着更精细的时空维度深入，一系列新发现不断深化对该调控网络的认知。研究表明，表观遗传调控机制在物种间存在显著差异，不同植物可能通过不同的表观机制实现再生[60]；Guo等[70]利用杂交杨树系统研究发现，芽再生过程中，来源于不同亲本的等位基因甲基化模式与基因表达保持相对独立。综上所述，表观遗传调控网络可能与代谢、离子信号等生理过程存在耦联，共同构成了植物再生背后多维、动态的表观遗传调控景观。

4　不依赖组织培养的“原位转化”技术

前文系统阐述了基因递送系统的创新发展、发育调控因子及表观调控因子的工程化应用，这些进展为实现高效遗传转化奠定了核心工具基础。但传统转化流程高度依赖离体组织培养，不仅操作步骤繁琐，还受到基因型的显著限制。“原位转化”（*in planta* transformation）技术的核心目标是整合并应用上述种类工具，直接在完整植株或特定器官中完成基因递送、细胞重编程及再生过程，从而彻底或部分绕过离体组织培养过程。从本质而言，原位转化是一个多技术整合的工具体系：首先依赖于高效、适配的递送系统，将外源组件送入植物适宜部位，其次需要借助发育调控因子或多肽信号，主动诱导细胞重编程与再生结构发生，同时，还可结合可视化标记技术，实现转化事件的快速初筛。本章将重点综述该领域的主要技术路径，这些路径均清晰体现了从“离体经验操作”向“原位理性设计”的范式转变。

4.1 发根农杆菌介导的毛状根转化与再生系统

发根农杆菌（*Agrobacterium rhizogenes*）侵染能够在不依赖激素、不需要无菌环境的情况下，在侵染部位直接诱导产生转基因毛状根，为根特异表达基因功能研究、根生理及根际微生物互作研究提供了高效的瞬时表达平台[71]。利用发根农杆菌递送CRISPR组件，也可作为基因编辑效率快速验证和高通量筛选的强大工具。无菌条件下诱导得到的毛状根也可作为稳定遗传转化的外植体，因此也是连接瞬时转化与稳定遗传转化的重要桥梁。

4.2 基于“切–浸–萌芽”策略的原位转化系统

近年来，一类基于“切–浸–萌芽”（Cut-Dip-Budding, CDB）策略的简化原位转化方法在多种植物中取得了显著成功。该方法的核心操作是：在植株顶芽、腋芽等分生组织处制造切口，随后用农杆菌侵染液侵染切口部位，利用植物自身的创伤响应与再生能力，在伤口部位直接诱导形成转基因芽。CDB策略彻底绕过了离体组织培养步骤，具有操作简便、周期短、无需昂贵设备、对基因型依赖度较低等突出优点，在蒲公英（*Taraxacum mongolicum*）和地黄（*Rehmannia glutinosa*）[72]、长寿花（*Kalanchoe blossfeldiana*）和虎尾兰（*Sansevieria trifasciata*）[73]等植物中都得到了成功应用。

一个类似的方法是将农杆菌侵染液注射到植物组织内，农杆菌通过韧皮部传递到分生组织中，并诱导转基因不定根或侧芽的形成，最终实现在非组培条件下的植株再生，该策略被称为RAPID（regenerative activity-dependent in planta injection delivery）[74]。运用该方法成功对红薯（*Ipomoea batatas*）、马铃薯（*Solanum tuberosum*）和番薯藤（*Ipomoea pescaprae*）等植物进行高效遗传转化。

4.3 发育调控因子驱动的原位分生组织诱导

对于再生能力较弱的植物，研究人员将CDB或RAPID策略与发育调控因子（如BBM、WUS等）的递送相结合，以主动增强伤口部位细胞的重编程与再生能力，进而在植株非分生组织部位直接诱导形成新的分生组织，从而完全或部分绕过愈伤组织阶段[75]。2020年，Cody等[76]报道了DD（direct delivery）和Fast-TrACC（fast-treated *Agrobacterium* co-culture）技术，在本氏烟中使用再生调控因子WUS2、BBM和IPT，直接在幼苗上诱导出能够发育成完整植株的新生分生组织。

除此之外，通过WIND1和IPT以及CRISPR组分的组合应用，在本氏烟、番茄、大豆植株的节间直接诱导出转基因或基因编辑的新芽[52]。这些研究表明，通过理性设计与组合关键发育调控因子，能够实现对再生位点的精准操控，推动“组织培养无关”转化平台的发展，同时针对特定植物的技术参数仍需精细优化。

4.4 可视化标记系统在转基因筛选中的应用

原位转化过程无需组培，更依赖快速筛选，因此灵敏可靠的可视化标记系统的使用将极大提高原位转化的筛选效率。目前经典的可视化标记系统包括GUS等酶促报告系统、GFP、DsRed、mCherry等荧光蛋白报告系统，以及荧光素酶等生物发光报告系统。但上述系统均存在明显局限性：GUS染色为有损检测，且需添加底物、染色反应耗时较长；荧光蛋白检测依赖专用设备，且信号相对较弱，难以精准观测；生物发光系统通常需要外源添加底物，且信号强度低、持续时间短，不适合高通量筛选或田间初步鉴定。

近年来开发的RUBY系统，因表型直观、物种普适性强等优势受到广泛关注。该系统通过表达3个甜菜红素合成基因，使转化组织呈现红色，实现了转基因事件的无损、快速、直观鉴定[77]。利用*PL1*、*ANT1*等花青素合成相关调控基因作为可视选择标记，也在多种作物遗传转化中展现出良好的应用效果[78]。这些可视化工具与前述再生增强技术联用，共同构建了更高效、更便捷的植物遗传转化与基因编辑平台。

5 总结与未来展望

5.1 核心进展总结

近年来，植物再生与遗传转化领域的核心进展体现在：（1）关键调控因子的工程化应用，特别是GRF-GIF嵌合蛋白的使用，为跨越基因型障碍提供了普适性工具；（2）表观遗传重编程机制的解析与干预，揭示了染色质状态动态在细胞命运决定中的核心作用，并催生了化学干预新策略；（3）递送系统的多元化创新，三元载体、纳米材料及病毒载体等提升了外源生物大分子的递送效率与适用范围；

（4）原位转化技术的兴起，如CDB、Fast-TrACC等策略，正推动遗传操作向“非组织培养依赖”方向演进。

当前的重要趋势是将上述技术模块化整合，构建一体化的解决方案。例如，将高效递送系统（如三元载体）、可视化标记（如RUBY）、再生增强因子（如GRF-GIF）与CRISPR/Cas9编辑工具耦合，借助原位转化方法进行递送，有望实现从基因递送、编辑、再生到鉴定的全流程优化。事实上，这种融合已见端倪，Prusty等[38]将GRF4-GIF1与RUBY可视化标记系统结合，成功用于小麦和大麦的转化与编辑事件筛选，并进一步通过编辑RUBY通路基因实现编辑子的便捷初筛，为技术模块的集成应用提供了有益示范。

5.2　重要挑战与关键科学问题

尽管进展显著，该领域仍面临一系列深层挑战，制约其真正迈向“理性设计”。

一是植物再生的机制尚未完全解析。植物再生是一个由激素信号、机械力、细胞形态及表观遗传状态共同调控的高度动态、自组织过程[54]。然而，目前对该过程在单细胞分辨率和连续时空维度上的解析仍然不足[79]。

二是技术工具的物种适配性问题。调控因子的功效常具有物种特异性，例如，小麦TaGRF4-GIF在大麦中不仅无法发挥再生促进作用，反而会抑制再生进程[38]，WUS、BBM在部分植物中的应用也会产生不利的发育表型[43，80]。同样，基因递送系统的效率、原位转化策略的适用性也受到宿主生理与遗传背景的显著影响，目前尚未形成普适性理论框架，用于预测并指导不同植物中最优技术工具的组合与应用。

三是生物安全问题。实现高效、精准且无外源DNA整合的基因编辑，并确保编辑性状的稳定遗传，仍是植物遗传转化领域的技术难点。与此同时，病毒载体在环境中的传播、重组及致病性恢复风险尚需系统评估；纳米材料颗粒在植物体及土壤生态系统中的持久性、迁移行为及潜在毒性尚不明确；遗传转化操作中用到的天然或合成基因及调控元件在植物群体中的潜在扩散风险也需纳入考量。针对上述风险，建立一套与之匹配、科学合理的生物安全评估体系与监管机制，已成为推动这些技术规模化应用的迫切需求。

5.3　未来发展路径

为化解前述相关挑战并推动植物遗传转化技术的优化发展，后续可统筹多个方向共同推进，逐步搭建高效、简便且成本可控的植物遗传操作技术体系。

近来的研究重心为工具箱的优化、整合现有技术并完成标准化、降低技术使用成本和操作门槛。第一，要把已验证过的再生调控因子系统梳理整合，搭建可共享的再生调控“工具库”；第二，优化原位转化流程，同时整合RUBY等无损可视化标记技术，构建低成本、高通量的遗传转化和阳性初筛体系；第三，开发可响应生物或环境信号的诱导型载体，完成对外源基因表达或基因编辑过程的精准时空调控。整体上看，这一阶段的核心目标是将前沿研究成果转化为稳定、易用的标准化操作方案。

中期阶段研究方向为围绕整个再生调控过程的机制解析。运用单细胞组学这类高分辨率技术，从时空维度动态解析再生过程中细胞重编程的分子与表观遗传变化轨迹。在此基础上搭建整合多组学数据和相关AI工具的预测模型，用于筛选适配特定物种的最优策略，设计调控因子的最优组合。同时梳理医学等领域已明确生物活性的小分子，可为植物再生化学工具箱补充一类独有的、能快速验证的新化合物，加速再生调控剂的筛选。

长期目标是高效再生与性状设计的深度耦合，开展理性设计育种，加速农作物优质品种的培育。此外，还需要同时构建与技术创新相适应的生物安全评估与全球治理框架，推进以科学证据为基础的国际监管共识及社会接受度研究，保障技术实际应用的安全性、伦理规范性与可持续性，为粮食安全应用与农业领域长期可持续发展给出符合实际且可落地的解决路径。

参考文献

[1] Nivya VM, Shah JM. Recalcitrance to transformation, a hindrance for genome editing of legumes [J]. Front Genome Ed, 2023, 5: 1247815.

[2] 周媛, 贺贝, 童俊等. 杜鹃再生及遗传转化 [J]. 分子植物育种, 2025: 1-15.
Zhou Y, He B, Tong J, et al. Regeneration and genetic transformation

system of *Rhododendron* [J]. Mol Plant Breed, 2025, 1-15

[3] Sun Y, Hong Z, Wang W, et al. Establishment of an efficient and versatile genome editing platform for *L. ruthenicum* [J]. Plant Physiol, 2025, 199(2): kiaf486.

[4] Sun J, Li J, Zhao M, et al. Successful establishment of somatic embryogenesis and shoot organogenesis systems in *Catalpa bungei* C.A.Mey [J]. Plants (Basel), 2025, 14(17): 2688.

[5] Wittmer J, Pijnenburg M, Wijsman T, et al. Rational design of induced regeneration via somatic embryogenesis in the absence of exogenous phytohormones [J]. Plant Cell, 2025, 37(11): koaf252.

[6] Debernardi JM, Tricoli DM, Ercoli MF, et al. A GRF-GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants [J]. Nat Biotechnol, 2020, 38(11): 1274-1279.

[7] Zhang J, Hao Z, Ruan X, et al. Role of BABY BOOM transcription factor in promoting somatic embryogenesis and genetic transformation in a woody magnoliid *Liriodendron* [J]. Plant Cell Environ, 2025, 48 (7): 4859-4872.

[8] Xia X, Dong JW, Li AJ, et al. Amino acid transporters mediate autonomous delivery of nanoparticle vehicles into living plants [J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 6715.

[9] Aliu E, Ji Q, Wlazlo A, et al. Enhancing *Agrobacterium*-mediated plant transformation efficiency through improved ternary vector systems and auxotrophic strains [J]. Front Plant Sci, 2024, 15: 1429353.

[10] Jeong J-H, Jeon E-Y, Hwang MK, et al. Development of super-infective ternary vector systems for enhancing the *Agrobacterium*-mediated plant transformation and genome editing efficiency [J]. Hortic Res, 2024, 11(9): uhae187.

[11] Vandeputte W, Coussens G, Aesaert S, et al. Use of GRF-GIF chimeras and a ternary vector system to improve maize (*Zea mays* L.) transformation frequency [J]. Plant J, 2024, 119(4): 2116-2132.

[12] Butler NM, Jansky SH, Jiang J. First-generation genome editing in potato using hairy root transformation [J]. Plant Biotechnol J, 2020, 18(11): 2201-2209.

[13] Nguyen DV, Hoang TT, Le NT, et al. An efficient hairy root system for validation of plant transformation vector and CRISPR/Cas construct activities in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 770062.

[14] Liu Y, Zhang S, Zhang S, et al. Efficient transformation of the isolated microspores of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) by particle bombardment [J]. Plant Methods, 2024, 20 (1): 17.

[15] Li ZP, Thorpe C, Jiang S, et al. Measuring plasmodesmata-mediated intercellular trafficking using microparticle bombardment in arabidopsis and crops [J]. Curr Protoc, 2025, 5(8): e70194.

[16] Thorpe C, Luo W, Ji Q, et al. Enhancing biolistic plant transformation and genome editing with a flow guiding barrel [J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 5624.

[17] Vinzant K, Rashid M, Clouse DE, et al. From plants to plants: Plant-derived biological polymers as sustainable and safe nanocarriers for direct delivery of DNA to plant cells [J]. Nano Lett, 2025, 25 (14): 5572-5581.

[18] Shen D, Rajappa S, Zhao Y, et al. Amphibious microneedles for programmable delivery of biomolecules and microorganisms in living plants [J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 10993.

[19] Howell SH, Walker LL, Dudley RK. Cloned cauliflower mosaic virus DNA infects Turnips (*Brassica rapa*) [J]. Science, 1980, 208 (4449): 1265-7.

[20] Brisson N, Paszkowski J, Penswick JR, et al. Expression of a bacterial gene in plants by using a viral vector [J]. Nature, 1984, 310(5977): 511-514.

[21] Abrahamian P, Hammond RW, Hammond J. Plant virus-derived vectors: Applications in agricultural and medical biotechnology [J]. Annu Rev Virol, 2020, 7(1): 513-535.

[22] Weiss T, Kamalu M, Shi H, et al. Viral delivery of an RNA-guided genome editor for transgene-free germline editing in *Arabidopsis* [J]. Nat Plants, 2025, 11(5): 967-976.

[23] Li N, Deng C, Zhu Y, et al. Development of convenient potyvirus-based vectors for simultaneous expression of two heterologous proteins in solanaceous plants [J]. BMC Plant Biol, 2025, 25(1): 1572.

[24] Xu Y, Li R, Luo H, et al. Protoplasts: small cells with big roles in plant biology [J]. Trends Plant Sci, 2022, 27(8): 828-829.

[25] Liang Z, Chen K, Li T, et al. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes [J]. Nat Commun, 2017, 8: 14261.

[26] Kim JH. Biological roles and an evolutionary sketch of the GRF-GIF transcriptional complex in plants [J]. BMB Rep, 2019, 52(4): 227-238.

[27] Kong JX, Martin-Ortigosa S, Finer J, et al. Overexpression of the transcription factor *GROWTH-REGULATING FACTOR5* improves transformation of dicot and monocot species [J]. Front Plant Sci, 2020, 11: 572319.

[28] Li J, Pan W, Zhang S, et al. A rapid and highly efficient sorghum transformation strategy using GRF4-GIF1/ternary vector system [J]. Plant J, 2024, 117(5): 1604-1613.

[29] Yang Z, Zhao M, Zhang X, et al. *MIR396-GRF/GIF* enhances *in planta* shoot regeneration of *Dendrobium catenatum* [J]. BMC Genomics, 2024, 25(1): 543.

[30] Zhao Y, Cheng P, Liu Y, et al. A highly efficient soybean transformation system using GRF3-GIF1 chimeric protein [J]. J Integr Plant Biol, 2025, 67(1): 3-6.

[31] Swinnen G, Lize E, Loera Sanchez M, et al. Application of a GRF-GIF chimera enhances plant regeneration for genome editing in tomato [J]. Plant Biotechnol J, 2025, 23(9): 4044-4056.

[32] Feng Q, Xiao L, He Y, et al. Highly efficient, genotype-

independent transformation and gene editing in watermelon (*Citrullus lanatus*) using a chimeric *ClGRF4-GIF1* gene [J]. J Integr Plant Biol, 2021, 63(12): 2038-2042.

[33] Bull T, Debernardi J, Reeves M, et al. GRF-GIF chimeric proteins enhance in vitro regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation efficiencies of lettuce (*Lactuca* spp.) [J]. Plant Cell Rep, 2023, 42(3): 629-643.

[34] Sanchez ER, Price RJ, Marangelli F, et al. Overexpression of *Vitis GRF4-GIF1* improves regeneration efficiency in diploid *Fragaria vesca* Hawaii 4 [J]. Plant Methods, 2024, 20(1): 160.

[35] He Y, Bai ZM, Wu T, et al. AcGRF4-AcGIF1 chimeric protein improves the transformation and regeneration efficiency in kiwifruit [J]. Sci Hortic, 2025, 354: 114518.

[36] 沈文忠, 袁梦影, 黄丽婷等. 基于CRISPR/dCas9-TV系统激活发育调控因子表达提高柑橘转基因效率的研究 [J]. 园艺学报, 2025: 1-18.
Shen WZ, Yuan MY, Huang LT, et al. Enhancing citrus transformation efficiency by activating developmental regulators via the CRISPR/dCas9-TV system [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2025, :1-18

[37] Zhang Y, Liu J, Li Y, et al. Generation of novel *bpm6* and *dmr6* mutants with broad-spectrum resistance using a modified CRISPR/Cas9 system in *Brassica oleracea* [J]. J Integr Plant Biol, 2025, 67(5): 1214-1216.

[38] Prusty MR, Shatil-Cohen A, Kumar R, et al. Pigments to precision: RUBY aiding genetic transformation and genome editing in wheat and barley [J]. Physiol Mol Biol Plants, 2025, 31(4): 545-554.

[39] Li Y, Wang N, Feng J, et al. Enhancing genetic transformation efficiency in cucurbit crops through *AtGRF5* overexpression: Mechanistic insights and applications [J]. J Integr Plant Biol, 2025, 67(7): 1843-1860.

[40] Liebsch D, Palatnik JF. MicroRNA miR396, GRF transcription factors and GIF co-regulators: a conserved plant growth regulatory module with potential for breeding and biotechnology [J]. Curr Opin Plant Biol, 2020, 53: 31-42.

[41] Nosaki S, Ohtsuka M. The DNA binding of plant-specific GROWTH-REGULATING FACTOR transcription factors is stabilized by GRF-INTERACTING FACTOR coactivators [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2025, 89(5): 761-768.

[42] Cheng Z, Wen S, Wu Y, et al. Comparatively evolution and expression analysis of GRF transcription factor genes in seven plant species [J]. Plants (Basel), 2023, 12(15): 2790.

[43] Bakulin SD, Monakhos SG, Bruskin SA. Morphogenetic factors as a tool for enhancing plant regeneration capacity during in vitro transformation [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(17): 8583.

[44] Wang Y, Yang X, Wang W, et al. Efficient genetic transformation and gene editing of Chinese cabbage using *Agrobacterium rhizogenes* [J]. Plant Physiol, 2024, 197(2): kiae543.

[45] 马曦, 张金睿, 庄红梅等. 发根农杆菌介导的芜菁高效遗传转化体系建立 [J]. 园艺学报, 2025, 52(05): 1389-1398.
Ma X, Zhang JR, Zhuang HM, et al. Establishment of an efficient genetic transformation system mediated by *Agrobacterium rhizogenes* in turnip [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2025, 52(05):1389-1398

[46] Li Y, Geng Y, Qing X, et al. *ZmHSCF1* enhances *Agrobacterium*-mediated transformation frequency in commercial maize inbred lines by promoting embryogenic callus proliferation [J]. Plant Commun, 2025, 6(12): 101525.

[47] Jung JH, Mai TT, Kim E, et al. The GRF-GIF duo and AINTEGUMENTA act cooperatively for the meristematic competence of lateral organs in *Arabidopsis* [J]. J Exp Bot, 2025, 76: 6841-6852.

[48] Yarra R, Krysan PJ. GRF-GIF duo and GRF-GIF-BBM: novel transformation methodologies for enhancing regeneration efficiency of genome-edited recalcitrant crops [J]. Planta, 2023, 257(3): 60.

[49] Shinohara H, Mori A, Yasue N, et al. Identification of three LRR-RKs involved in perception of root meristem growth factor in *Arabidopsis* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(14): 3897-3902.

[50] Toyokura K, Goh T, Shinohara H, et al. Lateral inhibition by a peptide hormone-receptor cascade during *Arabidopsis* lateral root founder cell formation [J]. Dev Cell, 2019, 48(1): 64-75.

[51] Yang W, Zhai H, Wu F, et al. Peptide REF1 is a local wound signal promoting plant regeneration [J]. Cell, 2024, 187(12): 3024-3038.e14.

[52] Kshetry AO, Ghose K, Alok A, et al. A synthetic transcription cascade enables direct *in planta* shoot regeneration for transgenesis and gene editing in multiple plants [J]. Mol Plant, 2025, 18(12): 2066-2081.

[53] Hong C, Lee HG, Shim S, et al. Histone modification-dependent production of peptide hormones facilitates acquisition of pluripotency during leaf-to-callus transition in *Arabidopsis* [J]. New Phytol, 2024, 242(3): 1068-1083.

[54] Youngstrom C, Wang K, Lee K. Unlocking regeneration potential: harnessing morphogenic regulators and small peptides for enhanced plant engineering [J]. Plant J, 2025, 121(2): e17193.

[55] Velda AC, Rodriguez SaG, Descalsota MLV, et al. Thidiazuron-mediated and genotype-independent regeneration system for tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. J Appl Biol Biotechnol, 2023, 11(4): 128-134.

[56] Nakano T, Tanaka S, Ohtani M, et al. FPX is a novel chemical inducer that promotes callus formation and shoot regeneration in plants [J]. Plant Cell Physiol, 2018, 59(8): 1555-1567.

[57] Bednarek PT, Orłowska R, Mańkowski DR, et al. Glutathione and copper ions as critical factors of green plant regeneration efficiency of triticale *in vitro* anther culture [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 926305.

[58] Zhao H, Tan Z, Wen X, et al. An improved syringe agroinfiltration protocol to enhance transformation efficiency by combinative use of 5-azacytidine, ascorbate acid and tween-20 [J]. Plants (Basel), 2017, 6(1): 9.

[59] Berenguer E, Carneros E, Pérez-Pérez Y, et al. Small molecule inhibitors of mammalian GSK-3β promote *in vitro* plant cell reprogramming and somatic embryogenesis in crop and forest species [J]. J Exp Bot, 2021, 72(22): 7808-7825.

[60] Chen C, Hu Y, Ikeuchi M, et al. Plant regeneration in the new era: from molecular mechanisms to biotechnology applications [J]. Sci China Life Sci, 2024, 67(7): 1338-1367.

[61] Zheng B, Liu J, Gao A, et al. Epigenetic reprogramming of H3K27me3 and DNA methylation during leaf-to-callus transition in peach [J]. Hortic Res, 2022, 9: uhac132.

[62] Choi SH, Ahn WS, Lee MH, et al. Effects of TSA, NaB, Aza in *Lactuca sativa* L. protoplasts and effect of TSA in *Nicotiana benthamiana* protoplasts on cell division and callus formation [J]. PLoS One, 2023, 18(2): e0279627.

[63] Hussain SS, Li Y, Liu J, et al. DNA hypomethylation activates the *RpMYB2*-centred gene network to enhance regeneration of adventitious roots [J]. Plant Cell Environ, 2025, 48(2): 1674-1691.

[64] Berenguer E, Bárány I, Solís MT, et al. Inhibition of histone H3K9 methylation by BIX-01294 promotes stress-induced microspore totipotency and enhances embryogenesis initiation [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 1161.

[65] Liu XM, Zhu K, Xiao J. Recent advances in understanding of the epigenetic regulation of plant regeneration [J]. aBIOTECH, 2023, 4 (1): 31-46.

[66] Lee K, Park OS, Choi CY, et al. *ARABIDOPSIS TRITHORAX 4* facilitates shoot identity establishment during the plant regeneration process [J]. Plant Cell Physiol, 2019, 60(4): 826-834.

[67] He C, Chen X, Huang H, et al. Reprogramming of H3K27me3 is critical for acquisition of pluripotency from cultured *Arabidopsis* tissues [J]. PLOS Genetics, 2012, 8(8): e1002911.

[68] Rymen B, Kawamura A, Lambolez A, et al. Histone acetylation orchestrates wound-induced transcriptional activation and cellular reprogramming in *Arabidopsis* [J]. Commun Biol, 2019, 2(1): 404.

[69] Zhang H, Guo F, Qi P, et al. OsHDA710-mediated histone deacetylation regulates callus formation of rice mature embryo [J]. Plant Cell Physiol, 2020, 61(9): 1646-1660.

[70] Guo Y, Feng Y, Yang G, et al. Allele-specific DNA methylation and gene expression during shoot organogenesis in tissue culture of hybrid poplar [J]. Hortic Res, 2024, 11(3): uhae027.

[71] Ron M, Kajala K, Pauluzzi G, et al. Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model [J]. Plant Physiol, 2014, 166(2): 455-469.

[72] Cao X, Xie H, Song M, et al. Simple method for transformation and gene editing in medicinal plants [J]. J Integr Plant Biol, 2024, 66 (1): 17-19.

[73] Lu J, Li S, Deng S, et al. A method of genetic transformation and gene editing of succulents without tissue culture [J]. Plant Biotechnol J, 2024, 22(7): 1981-1988.

[74] Mei G, Chen A, Wang Y, et al. A simple and efficient in *planta* transformation method based on the active regeneration capacity of plants [J]. Plant Commun, 2024, 5(4): 100822.

[75] Niu YX, Wu QY, Ren SN, et al. Developmental regulators and additives in promoting genetic transformation and genome editing efficiency [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 230: 110811.

[76] Cody JP, Maher MF, Nasti RA, et al. Direct delivery and fast-treated *Agrobacterium* co-culture (Fast-TrACC) plant transformation methods for *Nicotiana benthamiana* [J]. Nat Protoc, 2023, 18(1): 81-107.

[77] He Y, Zhang T, Sun H, et al. A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation [J]. Hortic Res, 2020, 7: 152.

[78] Kumar M, Ayzenshtat D, Rather GA, et al. Breaking the glass ceiling of stable genetic transformation and gene editing in the popular pepper cv Cayenne [J]. J Exp Bot, 2025, 76(10): 2688-2699.

[79] Tang L, Zhai L, Li J, et al. Time-resolved reprogramming of single somatic cells into totipotent states during plant regeneration [J]. Cell, 2025, 188(24): 6923-6938.e18.

[80] Yavuz C, Tek AL, Çalışkan ME. Induction of chromosomal aberrations with ectopic expression of native *BABY BOOM1* (*GmBBM1*) in soybean [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2024, 158(3): 59.

（责任编辑　张婷婷）

生物技术通报
· 综述与专论 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):13-26

类胡萝卜素调控植物花色和果色机制研究进展

李富伟 李宏宇*
（沈阳大学生命科学与工程学院,沈阳 110000）

摘 要： 类胡萝卜素是形成园艺植物花器官和果实色泽的重要色素，直接影响产品的观赏和经济价值。与叶片等光合器官不同，植物花、果发育着色过程中，类胡萝卜素的积累常伴随叶绿素降解及类黄酮等次生代谢物的显著变化，该过程受多层级调控网络协同调控。近年来，类胡萝卜素介导园艺植物花果着色的分子调控机制的研究发展迅速。本文全面总结该领域研究进展，明确*PSY*等类胡萝卜素合成关键酶基因和有色体分化与色素储存在代谢通路多样性中的核心作用。该代谢过程受到转录、转录后及表观遗传层面协同调控。在转录调控水平，MYB、bHLH、NAC、WRKY、AP2/ERF等转录因子构成复杂调控网络，通过靶向*PSY*、*LCYB*、*CCD4*等关键基因精准维持类胡萝卜素合成与降解的动态平衡。转录后调控层面，ORANGE蛋白对PSY的稳定作用、泛素化介导的蛋白降解、PPR蛋白调控以及miRNA介导的转录后沉默等多种机制，协同实现代谢通量的精细微调。表观遗传方面，DNA甲基化与组蛋白修饰动态调控关键基因染色质状态，影响色素积累的时空模式。同时，光照、温度等环境因子与乙烯、脱落酸等植物激素信号可整合至上述调控网络，共同决定花果颜色。本文全面梳理该多层面协同互作调控体系，深入揭示类胡萝卜素在花果着色中的合成与降解平衡机制，并基于此分析园艺产品色泽改良与分子育种实践中的关键问题及发展路径，为园艺产品色泽性状的精准调控与品质提升提供理论支撑和技术指导。

关键词： 类胡萝卜素；花色；果色；转录调控；表观遗传调控；转录后调控；代谢途径
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1235

Research Progress in the Mechanism of Carotenoids Regulating Plant Flower Color and Fruit Color

LI Fu-wei LI Hong-yu*
(*College of Life Science and Bioengineering, Shenyang University, Shenyang* 110000)

Abstract: Carotenoids are important pigments that determine the color of floral organs and fruits in horticultural plants, directly influencing their ornamental and economic value. Unlike that in photosynthetic organs such as leaves, the accumulation of carotenoids during the development and coloration of plant flowers and fruits is often accompanied by significant changes in chlorophyll degradation and levels of secondary metabolites such as flavonoids, a process that is coordinately regulated by a multi-level regulatory network. In recent years, research on the molecular regulatory mechanisms of carotenoid-mediated flower and fruit coloration in horticultural plants has developed rapidly. This paper comprehensively summarizes research progress in this field, clarifying the core roles of key enzymes encoded by carotenoid biosynthetic genes such as *PSY* and the processes of chromoplast differentiation and pigment storage in the diversity of metabolic pathways. This metabolic process is coordinately regulated at the transcriptional, post-transcriptional, and epigenetic levels. At the transcriptional level, transcription factors such as MYB, bHLH, NAC, WRKY, and AP2/ERF form complex regulatory networks, precisely maintaining the dynamic balance between carotenoid biosynthesis and degradation by targeting key genes including *PSY*, *LCYB*, and *CCD4*. At the post-transcriptional level, multiple mechanisms, including the stabilization of PSY by ORANGE proteins, ubiquitination-mediated protein degradation, PPR protein regulation, and miRNA-mediated post-transcriptional silencing, coordinately achieve fine-tuning of metabolic flux. Epigenetically, DNA methylation and histone modifications dynamically regulate the chromatin state of key genes, thereby affecting the spatiotemporal patterns of

收稿日期：2025-11-15
基金项目：国家自然科学基金项目（32371957），辽宁省种质创新藏粮于技专项计划项目（2023JH1/10200010）
*通信作者：李宏宇 43064@syu.edu.cn

pigment accumulation. Meanwhile, environmental factors such as light and temperature, as well as phytohormone signals like ethylene and abscisic acid, can be integrated into the above regulatory network to jointly determine flower and fruit color. This paper comprehensively reviews this multi-level coordinated and interactive regulatory system, deeply reveals the balance mechanism of carotenoid biosynthesis and degradation in flower and fruit coloration, and based on this, analyzes key issues and development pathways for color improvement and molecular breeding of horticultural products, providing theoretical support and technical guidance for the precise regulation of color traits and quality improvement of horticultural products.

Keywords: carotenoids; flower color; fruit color; transcriptional regulation; epigenetic regulation; post-transcriptional regulation; metabolic pathways

园艺作物的花色与果实颜色是评价其经济价值的重要指标。植物色素包括花青素类、类胡萝卜素以及甜菜素3大类。其中，类胡萝卜素不仅赋予花朵和果实鲜艳的色泽，也作为维生素A前体和强效抗氧化剂，在人体视觉健康、免疫调节及慢性病预防中发挥重要作用[1]。类胡萝卜素的种类、积累水平以及代谢转变，直接影响花朵和果实的色泽和品质。与叶片等光合器官不同，花朵和果实的着色伴随着叶绿素降解、质体分化以及色素代谢流的复杂生物学过程，并受到发育信号、环境因子及多层级基因网络的精密协同调控。

近年来，随着分子生物学和遗传工程技术的进步，类胡萝卜素着色机制成为植物次生代谢研究热点。研究重点由类胡萝卜素生物合成与降解途径转向转录调控机制，逐步揭示了多个转录因子家族通过复杂互作网络，精准调控关键酶基因的时空表达。近期研究进一步延伸至蛋白稳定性调控、miRNA介导的基因沉默及表观遗传修饰，初步揭示代谢通量在转录后与染色质水平的精细调控[2]。全面阐明类胡萝卜素参与花、果等有色器官着色的调控网络，不仅有助于深化对植物色素代谢途径的认识，也为通过代谢工程与分子设计育种精准改良园艺作物色泽与营养品质提供了关键靶标与策略。本文旨在系统总结近年来在园艺植物花果着色过程中，类胡萝卜素合成与降解代谢途径中受到的多层级调控网络，以及光照、温度等环境因子与乙烯、脱落酸等植物激素信号的整合作用机制，并探讨其在花果色泽定向改良及高品质分子育种中的应用。

1 类胡萝卜素与植物花色和果色的关系

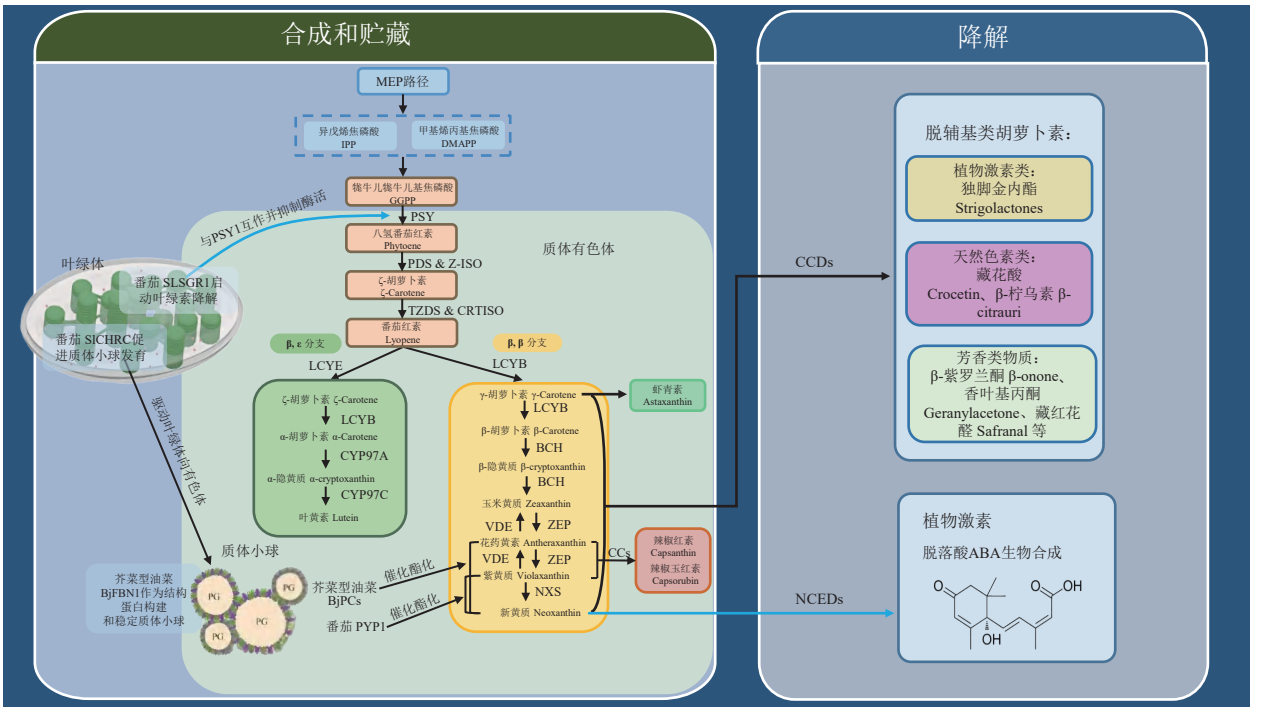
类胡萝卜素的基本结构单元包含C40共轭多烯链及末端碳环结构，根据是否存在氧原子，分为胡萝卜素与叶黄素两类。在光合组织中，叶黄素主要以游离形式存在[3]，而在多数非光合组织中，叶黄素常以酯化形式在有色体中积累，但番茄成熟果实是特例[4]。各种类胡萝卜素在花与果实中吸收特定波长的光线，使其呈现红、橙、黄等色泽。红色的花朵和果实通常源于番茄红素、辣椒红素等吸收蓝绿光的类胡萝卜素。例如番茄（*Solanum lycopersicum*）的红色果实主要源于番茄红素的积累[5]，而辣椒的红色果实则主要由辣椒红素决定[6]。虾青素在大多数高等植物中无法合成，天然分布极为有限[7]。浅黄色至深黄色的花和果实中，往往积累大量吸收蓝光的叶黄素酯。例如，白菜（*Brassica rapa*）的黄色花由叶黄素、紫黄质和新黄质3种类胡萝卜素决定[8]。橙黄色花朵中积累的类胡萝卜素成分比较复杂。β-胡萝卜素主要吸收蓝紫光，呈现橙黄色。然而，橙色的花和果实，往往源于多种类胡萝卜素的共同积累。例如，百合属（*Lilium* spp.）植物橙色花是红色辣椒红素和多种叶黄素共同积累的结果[9]。胡柚（*Citrus changshanensis*）中，红褐色的β-柠乌素（β-citraurin）是橙红色果皮着色的关键[10]。此外，在植物花和果实发育中，类胡萝卜素水平受其合成和代谢平衡的直接影响。例如，布朗百合（*Lilium brownii*）花朵开放初期呈黄色，后因降解过程被激活而褪白，最终呈白色[11]。总体上，类胡萝卜素的种类、积累水平及酯化程度共同决定花和果实的色泽。

2 植物类胡萝卜素生物合成和降解的途径

类胡萝卜素的代谢涉及合成、储存、转运和降解过程。合成途径以质体MEP途径提供的碳源为起点，经GGPPS催化生成前体GGPP，不同GGPPS亚型具有明显的组织表达特异性，分别调控叶片与花

果的代谢流向[12]。PSY催化GGPP缩合为八氢番茄红素是首个限速步骤，其功能缺失或定位异常（如番茄黄色突变体）是合成受阻的主因[13-14]。PDS、ZDS与CRTISO功能异常干扰下游色素合成，CRTISO活性差异可阻碍顺式异构体向反式构型转化，进而引发花色改变[15-16]。番茄红素处于代谢分支点，LCYE与LCYB竞争性地将其分配至β,ε-与β,β-分支，分支代谢流比例对色泽多样性具有重要作用。德国鸢尾（*Iris germanica*）*IgLCYB2*的表达水平调控代谢物流向β,β-分支的强度，使花色在粉、橙、黄间转变[17]。在合成通路下游，油菜BnaZEP家族成员影响花瓣叶黄质与紫黄质的比例，调控花色由黄转橙[18-19]。可见，类胡萝卜素合成途径的限速酶、分支点及下游关键酶共同决定色素积累水平与组成比例（图1），并与降解动态平衡。

在类胡萝卜素储存过程中，有色体作为储存色



类胡萝卜素在质体中合成，经GGPPS催化生成前体GGPP，再经PSY缩合及多步脱氢异构反应生成番茄红素，随后分为β,β和β,ε两个分支。β,β分支中，LCYB催化生成β-胡萝卜素，进一步衍生出玉米黄质、紫黄质、新黄质及脱落酸等；β,ε分支中，LCYE与LCYB协同催化生成α-胡萝卜素并最终形成叶黄素。箭头代表酶促代谢反应方向，黑色箭头代表直接调控，蓝色箭头代表间接调控。PSY：八氢番茄红素合酶；PDS：八氢番茄红素脱氢酶；Z-ISO：ζ-胡萝卜素异构酶；ZDS：ζ-胡萝卜素脱氢酶；CRTISO：类胡萝卜素异构酶；LCYE：番茄红素ε-环化酶；LCYB：番茄红素β-环化酶；CYP97A/C：细胞色素P450羟化酶；BCH：β-胡萝卜素羟化酶；CCS：辣椒红素/辣椒玉红素合酶；VDE：紫黄质脱环氧化酶；ZEP：玉米黄质环氧化酶；NXS：新黄质合酶；CCD：类胡萝卜素裂解双加氧酶；NCED：9-顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶。蓝色为前体MEP途径，橘红色为上游主干路径，绿色为β,ε-支路，黄色为β,β-支路，右侧为β,β-分支衍生物合成通路

Carotenoids are synthesized in plastids, where GGPPS catalyzes the formation of the precursor GGPP, which is subsequently converted to lycopene via PSY-mediated condensation and multi-step desaturation and isomerization reactions. The pathway then diverges into two branches: in the β,β-branch, LCYB catalyzes the cyclization of lycopene to β-carotene, which is further hydroxylated and epoxidized to yield zeaxanthin, violaxanthin, neoxanthin, and abscisic acid; in the β,ε-branch, LCYE and LCYB act cooperatively to produce α-carotene, which is ultimately converted to lutein. Arrows indicate the direction of enzymatic metabolic reactions; black arrows represent direct regulation, and blue arrows represent indirect regulation. PSY: phytoene synthase; PDS: phytoene desaturase; Z-ISO: ζ-carotene isomerase; ZDS: ζ-carotene desaturase; CRTISO: carotenoid isomerase; LCYE: lycopene ε-cyclase; LCYB: lycopene β-cyclase; CYP97A/C: cytochrome P450 hydroxylase; BCH: β-carotene hydroxylase; CCS: capsanthin/capsorubin synthase; VDE: violaxanthin de-epoxidase; ZEP: zeaxanthin epoxidase; NXS: neoxanthin synthase; CCD: carotenoid cleavage dioxygenase; NCED: 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase. Blue represents the MEP pathway for carotenoid precursor synthesis; orange indicates the upstream core backbone pathway; green indicates the β,ε-branch; yellow indicates the β,β-branch; the right side shows derivative synthesis from the β,β-branch

图1　类胡萝卜素生物合成途径

Fig. 1　Carotenoid biosynthesis pathways

素的特化质体，其分化过程和结构类型直接决定色素的积累模式与稳定性。有色体的发育受质体转换、微观结构变化和酯化作用的协同调控。一方面，*SGR*基因通过促进叶绿素降解，参与叶绿体向有色体的转变，并协同调控类胡萝卜素的合成与积累[20]。另一方面，不同类型有色体通过其独特的超微结构，影响类胡萝卜素的积累效率与代谢稳定性[21-23]。通常，晶体型有色体通过高浓度堆积产生强烈色泽[23]，膜片型有色体通过膜系统重组提供丰富的颜色层次[24]，而小球型有色体则依靠酯化类胡萝卜素与脂质基质结合形成稳定的复合体[25-26]。此外，纤维蛋白对质体小球发育的促进作用、类胡萝卜素酯化基因对结构完整性的维持[26]，甚至淀粉降解的延迟均可通过影响色素稳定储存调控花朵颜色[27]。可见，质体转换、酯化沉积与有色体发育相互关联、层层递进，与生物合成途径共同决定了植物花果的颜色表型。

在类胡萝卜素降解阶段，CCDs可识别并裂解多种有色类胡萝卜素，从而产生脱辅基类胡萝卜素[28-29]。CCDs与菊花（*Chrysanthemum* × *morifolium*）、矮牵牛（*Petunia* × *hybrida*）、百合、番红花（*Crocus sativus*）等多种植物白色花的形成密切相关[30]。在日本牵牛花（*Ipomoea nil* (L.) Roth）中，CRISPR/Cas9敲除*InCCD4*可使花瓣由白色转为淡黄色[31]。*CCDs*对果色的调控则更为复杂。红皮柑橘中，*CsCCD4b1*虽参与β-柠乌素合成，但其表达水平与果皮颜色或β-柠乌素积累并不呈简单正相关。β-柠乌素含量可能受转录后调控、底物供应及质体发育等多因素共同影响[32]。总体而言，CCDs对花色的影响较为直接，果色的形成则有赖于合成、储存与降解过程的协同调控。

综上，植物类胡萝卜素代谢的动态平衡由合成、储存与降解三大过程共同维持。合成通路的关键酶基因的差异性表达，直接决定色素组分与含量；有色体作为储存载体，为色素稳定积累提供物质支撑；CCD家族介导的降解过程，通过反向调控进一步完善代谢网络。三者共同构成园艺植物花果颜色形成的代谢基础。

3 影响植物花和果实中类胡萝卜素积累的因素

植物类胡萝卜素的代谢受到外界环境信号与内源激素水平的协同调控。光照、温度及各类植物激素作为关键调节因子，通过不同的途径调控代谢相关基因表达，从而影响花与果实的着色。

3.1 光照

光照是调控植物次生代谢的核心环境因子，其强度、光质及周期共同调控类胡萝卜素积累。不同遮光条件下，类胡萝卜素生物合成基因表现出差异积累模式。黑暗处理后，百日菊（*Zinnia elegans*）花瓣中光响应转录因子*ZeMYB32*表达量显著增加，结合并抑制*ZeCCD4-2*的转录、减少类胡萝卜素降解，使花瓣亮度、黄度和颜色饱和度显著增强[33]。光强对柑橘果皮类胡萝卜素合成的调控存在发育阶段特异性。在克里曼丁橘（*Citrus clementina*）和甜橙（*Citrus sinensis*）中，遮光可下调*PSY*、*PDS*、*ZDS1*、*LCY2a*、*LCY2b*、*CHX*的表达，进而抑制果皮中类胡萝卜素积累，而强光可增强果皮着色。成熟后期，遮光持续抑制但未完全阻断这些基因的表达[34]。除光强外，光质也是影响色素合成的重要因素。在甜橙、番茄、苹果（*Malus domestica*）、草莓（*Fragaria* × *ananassa*）、葡萄（*Vitis vinifera*）等多种植物果皮着色中，红光促进类胡萝卜素积累，导致果实呈橙色/黄色；蓝光促进花青素积累，导致果实呈红/紫色[35]。不同光质对类胡萝卜素合成的影响存在差异。辣椒果实发育中，红光特异性上调类胡萝卜素合成的中下游基因*LCYb*、*CrtZ*、*CCS*，促进辣椒红素积累和果实着色，而蓝光虽能在早期强烈诱导*PSY*表达，但对果实着色的促进弱于红光[36]。进入成熟期后，采收前的红光处理可加速辣椒果实由绿转红[37]。此外，光周期也在一定程度上影响类胡萝卜素合成[38]。总体而言，光照强度和光质对类胡萝卜素合成的调控具有物种与发育阶段特异性，且红光与蓝光的作用机制存在明显差异。

3.2 温度

温度是影响植物发育的重要环境因子。对于番茄果实，20-25 ℃是番茄红素合成的适宜温度，30 ℃以上的高温抑制番茄红素积累，并促进β-胡萝卜素合成，使果色变浅[39]。类似地，对于克莱门丁柑橘（*Citrus clementina* Hort. ex Tan.），土壤温度20-23 ℃有利于果皮类胡萝卜素积累和色泽发育；

当土温高于23 ℃，则延迟果皮颜色转变[40]。此外，在桂花（*Osmanthus fragrans*）中，高温抑制*OfLCYB1*并激活*OfCCD4-1*，减少类胡萝卜素积累，花色由黄转为黄白色；低温则促进类胡萝卜素积累，使花色由黄转为淡橙色[41]。温度对花朵和果实中类胡萝卜素积累的调控复杂且具有物种特异性，这一过程中温度信号的感知与转录整合机制仍不明确，有待深入研究。

3.3　植物激素

乙烯和脱落酸是调控器官成熟的重要激素，参与调控花和果实成熟过程中的类胡萝卜素积累。在番茄果实成熟过程中乙烯和光信号传导途径相互影响，协同调节类胡萝卜素合成。番茄*hp2*突变体对光信号超敏感，其果实成熟阶段过量富集类胡萝卜素，可能与乙烯代谢紊乱和信号传导输出增强相关。外源乙烯处理能够更强烈地促进*hp2*突变体果实中类胡萝卜素合成基因的表达[5]。ABA可激活桂花花瓣多个类胡萝卜素合成基因，导致花色加深[42]。总体而言，乙烯与脱落酸虽作用方式与调控节点各异，但均可正向促进类胡萝卜素积累。激素信号与光信号通路间的交叉互作，进一步揭示了类胡萝卜素代谢调控网络的复杂性与整合性。

4　花色果色形成中类胡萝卜素合成的转录调控

大量研究表明多种转录因子家族通过激活或抑制类胡萝卜素生物合成与降解途径中关键酶基因的表达，调控植物花、果等器官的色泽形成。

4.1　影响类胡萝卜素代谢的关键转录因子

4.1.1　MYB转录因子　MYB是植物基因组中最大的转录因子家族之一，常通过激活类胡萝卜素合成基因，促进其在花和果实中的大量积累。在桂花中，*MYB43*能够被CPTA诱导上调，进而促进*PDS*、*ZISO*、*ε-LCY*和*CCD4*的表达，增加花瓣类胡萝卜素含量，使花色转红[43]。在辣椒中，R-R型MYB转录因子DIVARICATA1直接结合*PSY*、*β-CH1*、*CCS*的启动子，促进辣椒红素积累、加速果实转色[6]。此外，CaMYB306也正向调控辣椒果实着色，沉默该基因可显著降低*CaPSY*、*CaBCH*、*CaZEP*表达与类胡萝卜素积累，使红果转为黄色[44]。鹅掌楸属植物*L. tulipifera*的R2R3-MYB转录因子RCP激活*LCYE*基因，促进类胡萝卜素合成进而形成花瓣橙色条纹；而中国鹅掌楸（*L. chinense*）*RCP*基因两个Indel变异后，无法激活*LCYE*，导致花瓣呈黄绿色[45]。此外，少量MYB家族成员可负向调控类胡萝卜素代谢基因的表达。瓯柑（*Citrus reticulata* cv Suavissima）的CrMYB68直接抑制*BCH2*和*NCED5*的表达，阻碍α-和β-胡萝卜素向叶黄素与ABA转化，造成果皮胡萝卜素过度积累、叶黄素缺乏，进而呈现留绿的着色异常表型[46]。综上，MYB转录因子家族通过多种方式调控植物类胡萝卜素代谢，多数成员正向激活合成基因以促进色素积累，少数起抑制作用，其调控模式具有明显的物种特异性与功能多样性。

4.1.2　NAC转录因子　NAC转录因子是植物特有的转录因子家族，多个成员通过调控类胡萝卜素合成影响果实着色。在番茄中，SlNAC4与SNAC9是类胡萝卜素积累的正向调控因子。沉默*SlNAC4*导致*SlPSY1*表达显著下降，总类胡萝卜素含量降低约30%，果实呈橙色而非正常红色[47]。SNAC9直接激活*PSY1*、*DXS2*、*SGR1*、*CrtR-b2*转录，敲除后总类胡萝卜素与番茄红素显著降低，叶绿素降解延缓，果实黄化且成熟延迟[48]。SlNAC1发挥负向调控作用，直接结合*SlPSY1*启动子并抑制其表达，同时上调*SlLCYb*、*SlLCYe*、*SlCYCB*以重定向类胡萝卜素代谢流，过表达该基因使成熟果实由红色变为黄色或橙色[49-50]。木瓜（*Carica papaya*）中，CpNAC1和CpNAC2直接结合并激活*CpPDS2/4*等基因的启动子，促进类胡萝卜素积累，调控果实转向黄色或红色[51-52]。金柑（*Fortunella crassifolia*）*FcrNAC22*受红光诱导表达，激活*FcrLCYB1*、*FcrBCH2*和*FcrNCED5*的启动子，促进类胡萝卜素积累和果实褪绿转色[53]。辣椒中，CaNAC2直接激活*CaCCS*促进辣椒红素和辣椒玉红素积累，并抑制ABA降解基因*CaCYP707A2*以提高ABA水平，后者经CaABF3形成正反馈回路进一步激活*CaNAC2*表达。*CaNAC2*沉默后，红色素积累减少而叶黄素含量相对增多，导致果实颜色由红转橙黄[54]。除影响类胡萝卜素合成外，CaNOR可通过激活*CaSGR*促进叶绿素分解，为类胡萝卜素合成创造条件，驱动辣椒果实由绿转红[55]。综上，NAC转录因子通过调控色素合成基因、介导激素信号反馈、促进叶绿素降解等多种方式，调控植物类

胡萝卜素代谢和果实色泽。

4.1.3 bHLH转录因子 bHLH是植物中仅次于MYB的第二大转录因子家族。番茄中，SlBZR1和SlPRE2分别是果实色素积累的正向和负调节因子。SlPRE2通过下调*SlPSY1*、*SlPDS*、*SlZDS*降低果皮叶绿素和类胡萝卜素含量，产生淡绿色的未成熟果实和黄化的成熟果实，而SlBZR1通过激活*SlPSY1*促进类胡萝卜素积累和果实着色[56-57]。木瓜中，CpbHLH1/2直接结合*CpCYC-B*和*CpLCY-B*启动子，分别抑制或促进其转录，调控番茄红素向β-胡萝卜素转化，从而影响果肉红/黄色转变[58]。在辣椒果实中，*bHLH032*、*bHLH048*、*bHLH095*和*bHLH100*等多个基因表达与叶黄素、玉米黄质和辣椒红素合成谱相似[59-60]。瓦伦西亚橙（*Citrus natsudai*）中，CsTT8可上调*CsDXR*、*CsHDS*、*CsHDR*、*CsPDS*、*CsLCYE*、*CsZEP*和*CsNCED2*的表达，增加果实类胡萝卜素含量，促进果皮转橙[61]。此外，甜橙（*Citrus sinensis* cv. Newhall）CsMYC2是茉莉酸信号通路中正向调控果皮类胡萝卜素积累的关键转录因子，可直接激活*CsCCD4b*、*CsLCYb*、*CsBCH*，协同促进β-柠乌素积累。同时，CsMYC2可转录激活*CsMPK6*，后者通过磷酸化降解CsMYC2并抑制其DNA结合活性，形成负反馈回路，精确调控着色强度以防止过度反应[62]。芒果（*Mangifera indica*）中，MiMYC2上调*MiSGR*、*MiRCCR*、*MiPSY*和*MiBCH*的表达，协同调控叶绿素降解与类胡萝卜素合成，促进果皮变黄[63]。可见，bHLH转录因子不仅在转录水平调控类胡萝卜素合成，部分成员还能通过负反馈回路在转录后水平精确控制着色强度。

4.1.4 AP2/ERF转录因子 AP2/ERF与多种植物的花和果实中类胡萝卜素代谢密切相关。番茄SlAP2a和SlERF6是乙烯合成的负调控因子，能够整合乙烯和类胡萝卜素合成通路。其中，SlAP2a抑制乙烯合成基因*ACS2*和*ACS4*的表达，同时促进*PSY1*表达、抑制*CYC-B*表达，影响果实中番茄红素与β-胡萝卜素的比例[64]，而SlERF6抑制乙烯合成的*ACS2*和*ACO1/3*基因，同时抑制类胡萝卜素途径的*DXS*和*HSP21*，阻碍果色转红[65]。晚熟甜橙（*Citrus sinensis* L. Osbeck）果实发育中，CsERF061受乙烯诱导后，直接转录激活*CsLCYb2*，促进果实着色。此外，CsERF061具有多靶向调控功能，可激活多个关键类胡萝卜素途径的基因，包括*PSY1*、*PDS*、*CRTISO*、*LCYb1*、*BCH*、*ZEP*、*NCED3*、*CCD1*和*CCD4*[66]。津巴多橘（*Citrus reticulata Blanco* '*Shiranui*'）CitERF5通过直接激活*CitBCH1*，促进β-隐黄质等的积累，增强果皮的橙红色泽[67]。AP2/ERF转录因子家族以多样化的方式调控果实类胡萝卜素代谢，其调控作用常与乙烯信号通路密切相关。

4.1.5 WRKY转录因子 WRKY转录因子也参与类胡萝卜素生物合成的调控。在番茄果实中，SlWRKY35可直接激活MEP途径关键基因*DXS1*，促进代谢流向类胡萝卜素合成和果实着色，而*SlWRKY16/17/53/54*的沉默会显著抑制番茄果实正常转红[68-69]。柑橘［(*C. unshiu* × *C. sinensis*) × *C. reticulata*］中，CrWRKY42是叶绿素降解和类胡萝卜素合成的双重正调节因子，可直接激活*CrBCH1*表达，过表达*CrWRKY42*可以促进果实由绿转黄[70]。可见，WRKY转录因子不仅直接调控类胡萝卜素合成基因，还可能调控MEP途径为色素合成提供前体。

4.1.6 PRR转录因子 PRR通过调控光周期感知和生物钟，间接影响植物花与果实的色素合成。PRR2亚家族基因*APRR2*及其同源基因可影响番茄、辣椒、西葫芦（*Cucurbita pepo*）等多种植物的果实颜色[71]。辣椒'Micropep Yellow'中，沉默*PRR2*显著降低类胡萝卜素水平[72]。而Lee等[73]进一步证实，c1位点的*CcPRR2*影响成熟果实中类胡萝卜素含量，而不是类型。目前，PRR转录因子调控类胡萝卜素代谢的功能已被多项研究证实，但其具体分子机制仍有待深入研究。

4.1.7 BBX转录因子 BBX是一类具有1个或2个B-box结构域的锌指转录因子，参与调控光形态建成。辣椒中，沉默*CaBBX20*会导致*CCS*表达下降、辣椒红素积累减少，果实颜色由红转橙[74]。番茄SlBBX20是光信号通路的重要正调控因子，直接激活*PSY1*并促进番茄果实着色[75]。某些BBX转录因子能协同调控多条色素代谢通路。芒果中，两种蓝光诱导的锌指蛋白转录因子MiBBX24和MiBBX27，激活花青素合成的正调节因子*MiMYB1*的同时启动*MiPSY*的表达[76]，协同调控花青素和类胡萝卜素合成，促进果实色素积累。综上，BBX转录因子调控

类胡萝卜素代谢的作用常与光信号通路密切相关。

4.1.8　MADS转录因子　MADS-box转录因子主要影响果实成熟和转色。辣椒（*Capsicum annuum*）中，MADS-RIN可直接转录激活*PSY1*和*CCS*以及*DIVARICATA1*，直接或间接调控类胡萝卜素合成，促进果实转红[77]。榴莲（*Durio zibethinus*）果实中，DzAGL6-1激活了*DzPSY*的启动子，瞬时表达可上调*PSY*转录水平和β-胡萝卜素含量[78]。在甜橙果实中，CsMADS5与CsMADS3促进类胡萝卜素的积累和果实着色。CsMADS5直接结合并激活*PSY*、*PDS*和*LCYb1*的启动子，而CsMADS3能直接激活*CsPSY1*、*CsLCYb2*和叶绿素降解基因*CsSGR*启动子，协同调控色素代谢平衡[79-80]。可见，MADS-box转录因子在果实类胡萝卜素积累过程中主要发挥正向调控作用。

4.1.9　其他转录因子　除了上述关键转录因子外，其他类型转录因子也可参与类胡萝卜素代谢调节。温州蜜柑（*Citrus unshiu* Marc.）果实着色中，CitZAT4直接激活*CitPSY*启动子，促进类胡萝卜素合成[81]。甜橙（*C. sinensis* L. Osbeck）果皮中，三螺旋转录因子（TTF家族）CsRP1直接激活*CsCCD4b*，催化β-柠乌素合成，调控果皮红化[82]。番茄CAMTA/SR转录因子SlSR3直接结合*PSY2*和*ZDS*的启动子并抑制其转录，使番茄红素合成受限，延缓果实着色[83]。

4.2　色素代谢通路协同调控机制

类胡萝卜素与类黄酮两大类色素的合成，常在转录水平上受到协同调控。如，猴面花（*Mimulus lewisii*）的黄色蜜导区，R2R3-MYB转录因子RCP1正向调控*PSY1*、*ZDS1*及*BCH1*等多个结构基因，促进类胡萝卜素在该区域积累。当*RCP1*以中等水平过表达时，在增强类胡萝卜素合成的同时，下调花青素合成途径的关键激活因子*PELAN*的表达，抑制*DFR*和*ANS*等花青素合成基因的转录。可见，RCP1在两条色素合成通路间建立起一种表达剂量依赖的拮抗调控关系[84]。除了拮抗调控外，某些MYB转录因子也可协同促进类胡萝卜素与花青素合成。在蒺藜苜蓿中，R2R3-MYB转录因子WP1不仅直接激活类胡萝卜素合成基因*MtLYCe*和*MtLYCb*，还与bHLH蛋白MtTT8及WD40蛋白MtWD40-1形成MBW复合体，进一步增强WP1对类胡萝卜素及花青素合成基因的转录激活能力，最终共同决定其黄底红脉的花色[85]。除MYB外，其他转录因子也可能具备整合两个通路的作用[76, 86]。番茄果实中，两个bHLH转录因子*SlBES1*与*SlBZR1*被油菜素内酯信号同时激活，SlBZR1直接激活*SlPSY1*，而SlBES1直接抑制类黄酮合成关键基因*SlMYB12*、*SlCHS1/2*和*SlF3′H*。二者协同作用，共同调控果实色泽与代谢分配[57, 87]。目前类胡萝卜素与类黄酮色素途径间的拮抗与协同调控机制备受关注，但其精细调控的系统性研究仍较有限，是未来花色形成与代谢调控研究的重要方向。

综上，尽管已鉴定出多个参与类胡萝卜素代谢的转录因子（表1），但对其转录调控网络的理解仍零散且不完整。多数研究缺乏内源功能验证、跨物种比较及多因子协同作用的探讨，完整的有色器官转录调控网络仍有待深入解析。

5　类胡萝卜素合成的转录后调控机制

除转录调控外，转录后调控在植物类胡萝卜素合成的精细调控中发挥重要作用。在蛋白水平上，类胡萝卜素合成关键酶PSY的丰度受到翻译后水平的严格调控。植物橙基因ORANGE（OR）家族蛋白是调控质体分化和类胡萝卜素生物合成的关键因子，它通过在蛋白质水平上与PSY直接互作，稳定PSY蛋白并防止其降解，提高花和果实类胡萝卜素含量[88-89]。番茄E3泛素连接酶PPSR1识别并泛素化修饰靶向PSY前体蛋白，使其经26S蛋白酶体降解，从而负向调控PSY的稳态水平。当PPSR1功能丧失时，PSY前体降解受阻，导致成熟PSY蛋白积累和类胡萝卜素含量提升[90]。ORANGE蛋白的稳定作用与PPSR1的降解作用相辅相成，共同在蛋白质水平上构成一个精细的双向调控网络，以精确控制类胡萝卜素的合成通量[89-91]。在辣椒（*Capsicum chinense*）中，PPR（pentatricopeptide repeat）蛋白被鉴定为类胡萝卜素代谢的关键转录后调控因子，通过CRISPR/Cas9敲除*PPR*后，导致叶黄素酯和玉米黄质酯等酯化色素水平下降，同时促进β-柠乌素等脱辅基类胡萝卜素的积累，从而改变类胡萝卜素的酯化谱与色素稳定性，最终影响果实颜色[92]。

在RNA水平上，非编码RNA，特别是miRNA，在植物基因表达调控中发挥重要作用。miRNA通过

表1 影响类胡萝卜素生物合成的关键转录因子

Table 1 Key transcription factors affecting carotenoid biosynthesis

转录因子 Transcription factors	物种 Species	作用机制 Regulatory mechanism	对色泽的作用 Impact on color		参考文献 Reference
			正向 Positive	负向 Negative	
MYB	桂花、辣椒、猴面花、鹅掌楸、柑橘、蒺藜苜蓿	直接结合启动子激活结构基因;少数成员抑制结构基因或招募抑制复合物	促进黄、橙、红色素积累	改变色素组成,导致留绿或褪色	[43-46, 84-85]
NAC	番茄、木瓜、柑橘、辣椒	部分成员直接激活合成基因,部分成员抑制限速步骤,部分成员调控叶绿素降解间接促进着色	促进果实转红或黄色积累	抑制番茄红素合成,导致黄/橙色果	[47-55]
bHLH	番茄、木瓜、柑橘、芒果	响应光照调控代谢流分支,部分成员直接激活/抑制结构基因,部分成员通过负反馈精确控制着色	促进类胡萝卜素合成与着色	淡绿色未成熟果实和黄化成熟果实	[56-58, 61-63, 87]
AP2/ERF	番茄、柑橘、津巴多橘	受乙烯诱导,广泛激活类胡萝卜素合成途径上游前体到下游修饰环节多个关键基因	上调柑橘类胡萝卜素,增强果皮橙红色泽与着色	下调番茄总类胡萝卜素和番茄红素含量,果色偏橙	[64-67]
WRKY	番茄、柑橘	激活MEP途径;激活合成基因;协同调控叶绿素降解	上调类胡萝卜素积累,驱动果实由绿色转为黄色或红色	—	[68-70]
BBX	辣椒、番茄、芒果	光形态建成调控因子,直接激活合成基因;部分成员协同调控花青素与类胡萝卜素通路	上调类胡萝卜素/花青素,促进辣椒、番茄、芒果着色	—	[74-76]
MADS	辣椒、柑橘、榴莲	直接激活合成结构基因启动子;部分成员同时激活叶绿素降解基因,协同调控色素代谢	促进类胡萝卜素积累,调控辣椒、柑橘、榴莲果实着色	—	[77-80]

与靶mRNA结合，使其降解或翻译抑制，从而负向调控基因表达。柑橘（*Citrus clementina*）中，多个miRNA靶向类胡萝卜素的代谢基因，可能调控柑橘果实着色[93]。在番茄中，7个miRNA靶向类胡萝卜素合成相关基因。miR169i-5p和miR1027a靶向*PSY*，miR482靶向*ZDS*，miR172靶向*CRTISO*，miR396靶向*LCYB*，而miR395则靶向*ZEP*[94]。这些不同类型的miRNAs通过靶向类胡萝卜素合成通路中的多个关键基因，构成一个转录后调控网络，从而实现对代谢流及终产物积累的精细控制。综上，转录后水平通过调控酶稳定性、质体发育、色素修饰和转录后沉默组成的多层次机制，协同调控类胡萝卜素积累和最终呈色。

6 类胡萝卜素生物合成的表观遗传修饰

表观遗传修饰通过改变染色质结构调控基因转录活性，是一类重要的基因表达调控方式。最近的研究表明，表观遗传修饰通过DNA甲基化与组蛋白翻译后修饰，实现对类胡萝卜素代谢相关基因表达的精细调控。

6.1 DNA甲基化

DNA甲基化是通过在特定碱基上添加甲基基团来调控基因表达的一种基因调控模式。在园艺植物中，DNA甲基化可抑制基因转录，进而调控花朵和果实中类胡萝卜素的积累。番茄果实的类胡萝卜素积累与DNA甲基化状态密切相关[95]。在番茄果实发育中，关键基因*PSY1*的启动子区域的DNA甲基化水平呈动态变化。在未成熟的绿色果实中，*PSY1*启动子呈高甲基化状态，基因沉默；进入成熟期后，其启动子发生主动去甲基化后被转录因子激活，从而驱动番茄红素的大量合成。这一过程是番茄果实由绿转红、类胡萝卜素爆发性积累的表观遗传开关[96]。花瓣中类胡萝卜素积累同样受到CCD等色素代谢关键基因启动子区域甲基化的影响。文心兰（*Oncidium*）中，*OgCCD1*是催化类胡萝卜素降解的关键基因。与黄色花‘Gower Ramsey’相比，白色花品种‘White Jade’的*OgCCD1*启动子呈现低甲基化状态，从而激活了该基因的转录，导致类胡萝卜素被大量降解，花瓣呈现白色[97]。在桂花中，

DNA甲基化抑制剂Aza处理后，诱导全基因组DNA低甲基化，激活*OfERFs*的表达，从而促进内源乙烯的合成与信号传递，协同增强类胡萝卜素积累，花色由黄转橙[98]。可见，类胡萝卜素代谢结构基因启动子区域的甲基化水平的动态变化，是调节花朵和果实色泽的重要方式。

6.2　组蛋白修饰

组蛋白修饰通过改变染色质结构，影响基因的转录活性。其中，组蛋白乙酰转移酶（HATs）与去乙酰化酶（HDACs）的动态平衡起着关键调控作用。HATs负责添加乙酰基，使染色质结构松弛，促进转录，而HDACs则移除乙酰基，使染色质结构紧缩，抑制转录。在番茄果实成熟过程中，这一平衡机制调控类胡萝卜素合成。沉默*HDAC*基因*SlHDT3*会导致*PSY1*表达下调，延缓果实成熟并抑制类胡萝卜素积累[99]。而转录因子SlAP2c通过其C端的EAR基序招募共抑制因子TPL2/4，进而与组蛋白去乙酰化酶HDA1/3形成复合体，直接抑制*SlPSY1*、*SlZISO*和*SlCRTISO*的表达[100]。在苹果（*Malus domestica* Borkh.）中，MdMYB44通过其EAR基序招募共抑制因子MdTPR1，进而与HDACs形成复合体，降低靶基因*MdCCD4*和*MdCYP97A3*启动区的组蛋白乙酰化水平来抑制其表达，从而调控类胡萝卜素组成和果实颜色[101]。由此可见，HATs与HDACs共同介导的组蛋白乙酰化动态平衡，在果实类胡萝卜素合成与积累过程中发挥调控作用。

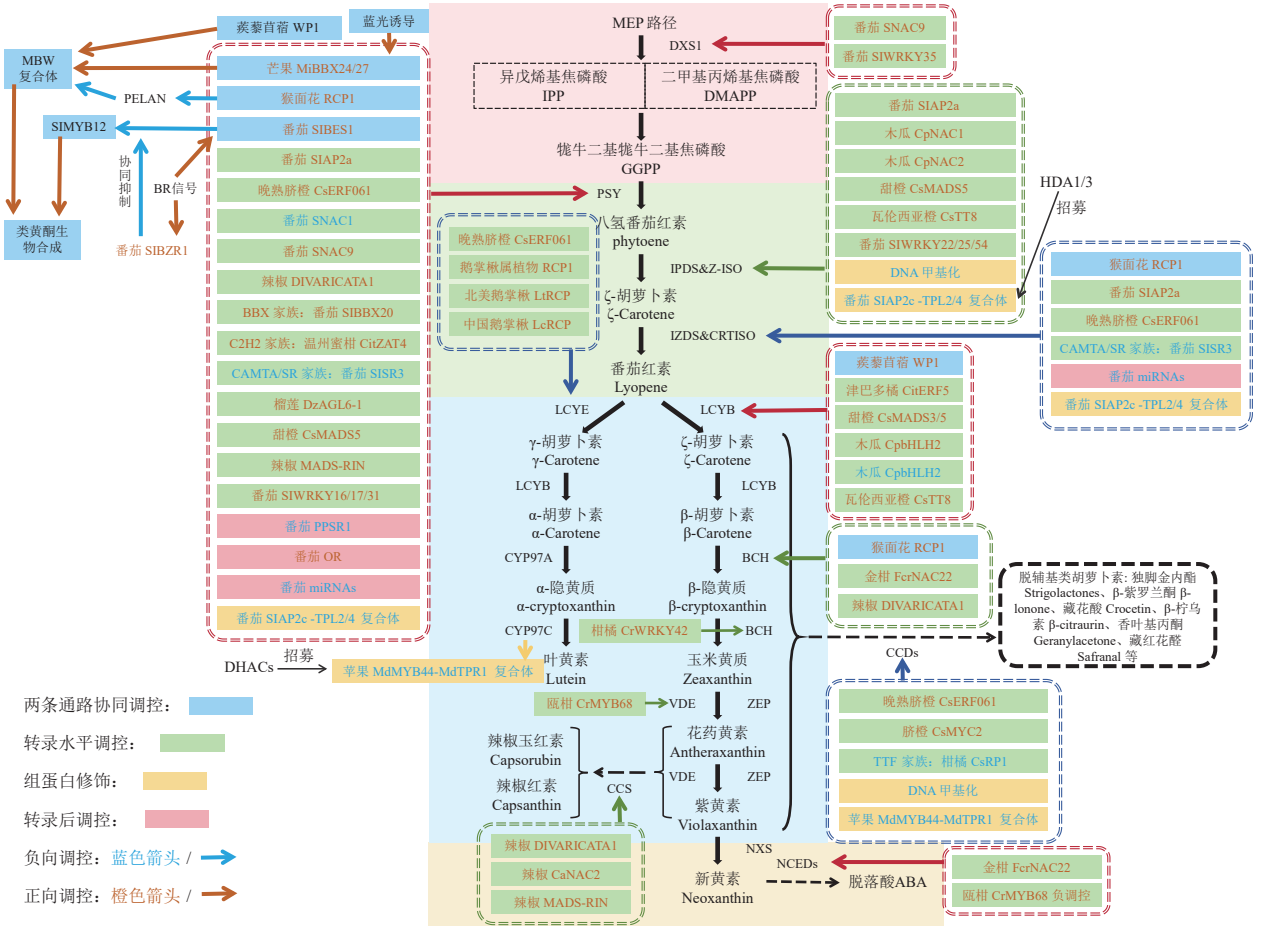
在植物花果着色过程中，类胡萝卜素代谢受多层次协同调控。在转录水平依赖多种转录因子家族激活或抑制合成基因，转录后水平通过蛋白稳定控制和miRNA精细调节代谢通量，表观遗传则通过DNA甲基化和组蛋白修饰动态重塑基因活性（图2）。

7　总结与展望

近年来，植物花与果实色泽形成的分子机制逐步被阐明。类胡萝卜素作为关键着色色素，其积累受内外多重因素调控。其中，类胡萝卜素生物合成途径是代谢基础，转录因子协调叶绿素降解、有色体形成及色素合成，并与转录后、表观遗传调控共同构成调控网络。同时，环境因素与植物激素通过复杂的信号传导途径，调控类胡萝卜素合成结构基因的表达及相关酶活性，最终影响植物花与果实的色泽。当前对类胡萝卜素调控植物色泽的研究虽已取得重要进展，但在揭示深层机制方面，仍面临以下关键挑战：（1）现有研究多聚焦于单个或少数基因的功能解析，缺乏对转录因子复合物形成、上下游级联关系、代谢反馈回路，以及色素代谢动态调控网的深入探讨，对转录调控网络的了解仍不完善；（2）多组学数据的整合应用仍显不足，难以系统解析类胡萝卜素合成相关转录调控网络的整体架构，不同转录因子间的互作关系尚未明确，转录因子与环境因子、内源激素间的协同调控机制也缺乏深入探究；（3）在色泽性状改良方面，虽然番茄、辣椒等重要作物取得了长足进展，然而对于多年生、无性繁殖的园艺植物，基因工程改良效率受限。传统转基因技术中外源基因表达易受植物内源调控系统干扰，导致类胡萝卜素积累效率不佳，且单一基因过表达难以突破代谢网络的整体限制，无法有效提升类胡萝卜素的合成通量。

针对上述挑战，基因编辑技术通过精准修饰植物内源基因，在规避外源DNA引入的同时实现代谢途径的精确调控，为突破育种瓶颈提供了新路径。目前，该技术虽已通过定向改造*PSY*、*LCY*等关键酶基因或敲除负调控因子提升了类胡萝卜素水平，但仍多局限于单一修饰，忽略了对色素稳定性及环境响应因子的协同改良，导致品种常面临稳定性差、适应性窄等局限。基于此，人们提出了多基因联合敲除等技术，并成功实现了番茄等少数植物果实色泽的有效改良[102]。未来的研究可重点发展“多基因联合编辑”引导代谢通路系统优化的新一代育种策略，具体包括：（1）整合基因组、转录组、代谢组及空间转录组数据，深度解析类胡萝卜素合成、修饰、转运及降解的代谢网络全景，精准锁定调控节点；（2）针对特定物种设计多基因协同编辑方案，通过“强化合成、削弱竞争”实现代谢流的定向汇聚与高效分配；（3）定向改良色素稳定性相关修饰酶及环境响应调控因子，系统性培育出色素含量高、化学稳定性强、环境适应性广的新品种。

综上，植物花与果实中类胡萝卜素代谢的调控网络呈现高度复杂性与精密性。随着多组学、基因编辑及分子互作等技术的快速发展，类胡萝卜素合成、降解、转运及储存的多层次调控机制研究将更



类胡萝卜素代谢受转录、转录后、翻译后及表观遗传水平的协同调控。在转录水平，MYB、NAC、bHLH、WRKY、AP2/ERF、MADS等转录因子发挥关键作用；其中，MYB、BBX和bHLH可协同调控类胡萝卜素与类黄酮代谢。PSY作为关键限速酶，LCYE/LCYB作为代谢分支点，均受到多层次调控。在转录后水平，ORANGE蛋白对PSY的稳定作用与PPSR1介导的降解作用形成互补的双向调控网络。在表观遗传层面，类胡萝卜素代谢受DNA甲基化与组蛋白乙酰化的动态变化的共同调控。橙色箭头和字体表示正向调控/促进作用；蓝色箭头和字体表示负向调控/抑制作用。浅绿色模块为转录因子家族；深粉色模块为转录后/翻译后调控；黄色模块为表观遗传修饰；蓝色模块为类黄酮与类胡萝卜素合成协同调控

Carotenoid metabolism is coordinately regulated at the transcriptional, post-transcriptional, post-translational, and epigenetic levels. At the transcriptional level, transcription factors such as MYB, NAC, bHLH, WRKY, AP2/ERF, and MADS play key roles; among them, MYB, BBX, and bHLH cooperatively regulate the biosynthesis of both carotenoids and flavonoids. PSY, as the key rate-limiting enzyme, and LCYE/LCYB, as metabolic branch points, are subject to multi-level regulation. At the post-transcriptional level, the stabilizing effect of ORANGE protein on PSY and the degradation mediated by PPSR1 form a complementary bidirectional regulatory network. At the epigenetic level, dynamic changes in DNA methylation and histone acetylation co-regulate the expression of key genes involved in carotenoid metabolism. Orange arrows and fonts indicate positive regulation/promotion; blue arrows and fonts indicate negative regulation/inhibition. Light green module is the transcription factor family; the dark pink module is post-transcriptional/post-translational regulation; the yellow module is epigenetic modification; the blue module is the synergistic regulation of flavonoid and carotenoid synthesis

图2 植物花果色泽形成中的类胡萝卜素代谢多层次调控机制

Fig. 2 Multi-level regulatory mechanism of carotenoid metabolism on color formation in plant flowers and fruits

加深入。揭示色素代谢的分子调控网络，能够完善植物次生代谢调控理论体系，为园艺作物色泽品质改良提供新思路与可行技术方案，最终推动优质、高价值园艺品种的培育与园艺产业高质量发展。

参考文献

[1] Gupta P, Hirschberg J. The genetic components of a natural color palette: a comprehensive list of carotenoid pathway mutations in plants [J]. Front Plant Sci, 2022, 12: 806184.

[2] Sun TH, Zhu QL, Wei ZQ, et al. Multi-strategy engineering greatly

enhances provitamin A carotenoid accumulation and stability in *Arabidopsis* seeds [J]. aBIOTECH, 2021, 2(3): 191-214.

[3] Mariutti LRB, Mercadante AZ. Carotenoid esters analysis and occurrence: What do we know so far [J]. Arch Biochem Biophys, 2018, 648: 36-43.

[4] Lewis ER, Nogueira M, Enfissi EMA, et al. The esterification of xanthophylls in *Solanum lycopersicum* (tomato) chromoplasts; the role of a non-specific acyltransferase [J]. Phytochemistry, 2021, 191: 112912.

[5] Cruz AB, Bianchetti RE, Alves FRR, et al. Light, ethylene and auxin signaling interaction regulates carotenoid biosynthesis during tomato fruit ripening [J]. Front Plant Sci, 2018, 9: 1370.

[6] Song JL, Sun BM, Chen CM, et al. An R-R-type MYB transcription factor promotes non-climacteric pepper fruit carotenoid pigment biosynthesis [J]. Plant J, 2023, 115(3): 724-741.

[7] Zhu QL, Zeng DC, Yu SZ, et al. From golden rice to aSTARice: bioengineering astaxanthin biosynthesis in rice endosperm [J]. Mol Plant, 2018, 11(12): 1440-1448.

[8] Guan ZL, Li XW, Yang JS, et al. The mechanism of white flower formation in *Brassica rapa* is distinct from that in other *Brassica* species [J]. Theor Appl Genet, 2023, 136(6): 133.

[9] 毕蒙蒙, 曹雨薇, 宋蒙, 等. 百合花色研究进展 [J]. 园艺学报, 2021, 48(10): 2073-2086.
Bi MM, Cao YW, Song M, et al. Advances in flower color research of Lilium [J]. Acta Hortic Sin, 2021, 48(10): 2073-2086.

[10] Luan YT, Wang SS, Wang RQ, et al. Accumulation of red apocarotenoid β-citraurin in peel of a spontaneous mutant of Huyou (*Citrus changshanensis*) and the effects of storage temperature and ethylene application [J]. Food Chem, 2020, 309: 125705.

[11] Wang X, Yamagishi M. Mechanisms suppressing carotenoid accumulation in flowers differ depending on the hybrid groups of lilies (*Lilium* spp.) [J]. Sci Hortic, 2019, 243: 159-168.

[12] Burbano-Erazo E, Ezquerro M, Sanchez-Bel P, et al. Specific sets of geranylgeranyl diphosphate synthases and phytoene synthases control the production of carotenoids and ABA in different tomato tissues [J]. Physiol Plant, 2025, 177: e70052.

[13] Zhou XS, Rao S, Wrightstone E, et al. Phytoene synthase: the key rate-limiting enzyme of carotenoid biosynthesis in plants [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 884720.

[14] Xiao Y, Kang BS, Li M, et al. Transcription of lncRNA ACoS-AS1 is essential to trans-splicing between SlPsy1 and ACoS-AS1 that causes yellow fruit in tomato [J]. RNA Biol, 2020, 17(4): 596-607.

[15] Zhao CJ, Bin Safdar L, Xie ML, et al. Mutation of the *PHYTOENE DESATURASE 3* gene causes yellowish-white petals in *Brassica napus* [J]. Crop J, 2021, 9(5): 1124-1134.

[16] Kishimoto S, Ohmiya A. Carotenoid isomerase is key determinant of petal color of *Calendula officinalis* [J]. J Biol Chem, 2012, 287 (1): 276-285.

[17] Zhao XJ, Yu F, Li X, et al. Identification and functional characterization of lycopene β-cyclase gene from Iris germanica and its relation to carotenoid accumulation [J]. J Plant Physiol, 2025, 315: 154620.

[18] Liu YJ, Ye SH, Yuan GG, et al. Gene silencing of *BnaA09.ZEP* and *BnaC09.ZEP* confers orange color in *Brassica napus* flowers [J]. Plant J, 2020, 104(4): 932-949.

[19] Wang ZZ, Wang XH, Li XY, et al. Genetic characterization and mechanistic insights into high seed oil content and orange petal trait in the rapeseed mutant opm1 [J]. Plant Physiol Biochem, 2026, 230: 110727.

[20] Ma LQ, Zeng N, Cheng K, et al. Changes in fruit pigment accumulation, chloroplast development, and transcriptome analysis in the CRISPR/Cas9-mediated knockout of Stay-green 1 (slsgr1) mutant [J]. Food Qual Saf, 2022, 6: fyab029.

[21] Wang Y, Tian C, Na QT, et al. The role of SlCHRC in carotenoid biosynthesis and plastid development in tomato fruit [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 281: 136354.

[22] Lu PJ, Wang RQ, Zhu CQ, et al. Microscopic analyses of fruit cell plastid development in loquat (*Eriobotrya japonica*) during fruit ripening [J]. Molecules, 2019, 24(3): 448.

[23] Wen X, Heller A, Wang KL, et al. Carotenogenesis and chromoplast development during ripening of yellow, orange and red colored Physalis fruit [J]. Planta, 2020, 251(5): 95.

[24] Egea I, Barsan C, Bian WP, et al. Chromoplast differentiation: current status and perspectives [J]. Plant Cell Physiol, 2010, 51 (10): 1601-1611.

[25] Ariizumi T, Kishimoto S, Kakami R, et al. Identification of the carotenoid modifying gene *PALE YELLOW PETAL 1* as an essential factor in xanthophyll esterification and yellow flower pigmentation in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. Plant J, 2014, 79(3): 453-465.

[26] Li RH, Zeng QY, Zhang XX, et al. Xanthophyll esterases in association with fibrillins control the stable storage of carotenoids in yellow flowers of rapeseed (*Brassica juncea*) [J]. New Phytol, 2023, 240(1): 285-301.

[27] Zeng XL, Tan YF, Wen X, et al. Delayed starch degradation triggers chromoplast structural aberration to inhibit carotenoid cleavage: a novel mechanism for flower color deepening in Osmanthus fragrans [J]. Horticulturae, 2025, 11(7): 864.

[28] Dhar MK, Mishra S, Bhat A, et al. Plant carotenoid cleavage oxygenases: structure-function relationships and role in development and metabolism [J]. Brief Funct Genom, 2020, 19(1): 1-9.

[29] Li WN, Che JH, Lian QL, et al. Identification and expression pattern of the carotenoid cleavage oxygenase gene family in Lycium

suggest CCOs respond to abiotic stress and promote carotenoids degradation [J]. Forests, 2023, 14(5): 983.

[30] Zhang CL, Zhu K, Huang CJ, et al. Identification of a carotenoid cleavage dioxygenase gene *TeCCD4a* regulating flower color and carotenoid content of marigold [J]. Gene, 2025, 969: 149760.

[31] Watanabe K, Oda-Yamamizo C, Sage-Ono K, et al. Alteration of flower colour in Ipomoea nil through CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of carotenoid cleavage dioxygenase 4 [J]. Transgenic Res, 2018, 27(1): 25-38.

[32] Luan YT, Wang SJ, Wang P, et al. Accumulation of β-citraurin and other carotenoids in relation to the expression of PSY1 and CCD4b1 in peel of twelve red-peeled citrus cultivars [J]. Sci Hortic, 2024, 330: 113094.

[33] Liu XY, Qing HS, Xu MH, et al. Light-responsive transcription factor ZeMYB32 negatively regulates ZeCCD4-2 to affect carotenoid accumulation in *Zinnia elegans* petals [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 228: 110315.

[34] Lado J, Alós E, Manzi M, et al. Light regulation of carotenoid biosynthesis in the peel of mandarin and sweet orange fruits [J]. Front Plant Sci, 2019, 10: 1288.

[35] Gong JL, Shen XC, Xu YN, et al. Differential regulation of red and blue LED light-induced carotenoid and anthocyanin biosynthesis in fruit peel [J]. Food Bioprocess Technol, 2025, 18(10): 8468-8481.

[36] Pola W, Sugaya S, Photchanachai S. Color development and phytochemical changes in mature green chili (*Capsicum annuum* L.) exposed to red and blue light-emitting diodes [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(1): 59-66.

[37] Mao PP, Yang Q, Yang T, et al. Red LED light accelerates capsanthin accumulation and fruit ripening in pre-harvest pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Front Plant Sci, 2025, 16: 1680730.

[38] Ma XJ, Hou Y, Yang S, et al. Effect of different photoperiods on the period of maturity of hot peppers (*Capsicum annuum* L.) and their changes in color [J]. Sci Hortic, 2024, 334: 113337.

[39] ElShamey E, Zeng YW, Ding YM, et al. Functional phytochemicals in tomatoes: biosynthesis, gene regulation, and human health implications [J]. Front Plant Sci, 2025, 16: 1662388.

[40] Mesejo C, Gambetta G, Gravina A, et al. Relationship between soil temperature and fruit colour development of 'Clemenpons' Clementine mandarin (*Citrus clementina* Hort ex. Tan) [J]. J Sci Food Agric, 2012, 92(3): 520-525.

[41] Wang YG, Zhang C, Xu B, et al. Temperature regulation of carotenoid accumulation in the petals of sweet osmanthus via modulating expression of carotenoid biosynthesis and degradation genes [J]. BMC Genom, 2022, 23: 418.

[42] Liu YC, Dong B, Zhang C, et al. Effects of exogenous abscisic acid (ABA) on carotenoids and petal color in *Osmanthus fragrans* 'yanhonggui' [J]. Plants, 2020, 9(4): 454.

[43] Xi W, He YH, Zhu LL, et al. CPTA treatment reveals potential transcription factors associated with carotenoid metabolism in flowers of *Osmanthus fragrans* [J]. Hortic Plant J, 2021, 7(5): 479-487.

[44] Ma X, Yu YN, Jia JH, et al. The pepper MYB transcription factor CaMYB306 accelerates fruit coloration and negatively regulates cold resistance [J]. Sci Hortic, 2022, 295: 110892.

[45] Yang LC, Wu HN, Bu ML, et al. Two indel variations in the *regulated carotenoid pigment* gene hold the key to the interspecies flower colour differentiation in *Liriodendron* plants [J]. Plant Biotechnol J, 2025: pbi.70488.

[46] Zhu F, Luo T, Liu CY, et al. An R2R3-MYB transcription factor represses the transformation of α- and β-branch carotenoids by negatively regulating expression of CrBCH2 and CrNCED5 in flavedo of *Citrus reticulate* [J]. New Phytol, 2017, 216(1): 178-192.

[47] Zhu MK, Chen GP, Zhou S, et al. A new tomato NAC (NAM/ATAF1/2/CUC2) transcription factor, SlNAC4, functions as a positive regulator of fruit ripening and carotenoid accumulation [J]. Plant Cell Physiol, 2014, 55(1): 119-135.

[48] Feng Y, Kou XH, Yuan S, et al. CRISPR/Cas9-mediated SNAC9 mutants reveal the positive regulation of tomato ripening by SNAC9 and the mechanism of carotenoid metabolism regulation [J]. Hortic Res, 2023, 10(4): uhad019.

[49] Ma NN, Feng HL, Meng X, et al. Overexpression of tomato SlNAC1 transcription factor alters fruit pigmentation and softening [J]. BMC Plant Biol, 2014, 14: 351.

[50] Meng C, Yang DY, Ma XC, et al. Suppression of tomato SlNAC1 transcription factor delays fruit ripening [J]. J Plant Physiol, 2016, 193: 88-96.

[51] Fu CC, Han YC, Fan ZQ, et al. The papaya transcription factor CpNAC1 modulates carotenoid biosynthesis through activating phytoene desaturase genes *CpPDS2/4* during fruit ripening [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(27): 5454-5463.

[52] Fu CC, Han YC, Kuang JF, et al. Papaya CpEIN3a and CpNAC2 co-operatively regulate carotenoid biosynthesis-related genes CpPDS2/4, CpLCY-e and CpCHY-b during fruit ripening [J]. Plant Cell Physiol, 2017, 58(12): 2155-2165.

[53] Gong JL, Zeng YL, Meng QN, et al. Red light-induced kumquat fruit coloration is attributable to increased carotenoid metabolism regulated by FcrNAC22 [J]. J Exp Bot, 2021, 72(18): 6274-6290.

[54] Song YY, Li XZ, Gao Y, et al. CaNAC2 orchestrates *Capsicum annuum* fruit ripening by coordinated carotenoid and ABA metabolism under epigenetic control [J]. Plant Physiol, 2025, 199(3): kiaf524.

[55] Yu SJ, Jeong ES, Lee S, et al. Regulatory link of CaSGR-CaNOR controls fruit shelf-life in pepper [J]. Postharvest Biol Technol,

2026, 234: 114107.

[56] Zhu ZG, Chen GP, Guo XH, et al. Overexpression of SlPRE2, an atypical bHLH transcription factor, affects plant morphology and fruit pigment accumulation in tomato [J]. Sci Rep, 2017, 7: 5786.

[57] Meng FL, Liu HR, Hu SS, et al. The brassinosteroid signaling component SlBZR1 promotes tomato fruit ripening and carotenoid accumulation [J]. J Integr Plant Biol, 2023, 65(7): 1794-1813.

[58] Zhou D, Shen YH, Zhou P, et al. Papaya CpbHLH1/2 regulate carotenoid biosynthesis-related genes during papaya fruit ripening [J]. Hortic Res, 2019, 6: 80.

[59] Liu RJ, Song JL, Liu SQ, et al. Genome-wide identification of the capsicum bHLH transcription factor family: discovery of a candidate regulator involved in the regulation of species-specific bioactive metabolites [J]. BMC Plant Biol, 2021, 21: 262.

[60] Shen LF, Zhang CF, Xia YH, et al. Transcript analysis reveals positive regulation of CA12g04950 on carotenoids of pigment pepper fruit under nitrogen reduction [J]. Agriculture, 2024, 14(4): 521.

[61] Sun Q, He ZC, Wei RR, et al. Transcription factor CsTT8 promotes fruit coloration by positively regulating the methylerythritol 4-phosphate pathway and carotenoid biosynthesis pathway in citrus (*Citrus* spp.) [J]. Hortic Res, 2023, 10(11): uhad199.

[62] Yue PT, Jiang ZH, Sun Q, et al. Jasmonate activates a CsMPK6-CsMYC2 module that regulates the expression of β-citraurin biosynthetic genes and fruit coloration in orange (*Citrus sinensis*) [J]. Plant Cell, 2023, 35(4): 1167-1185.

[63] Wang XP, You YQ, Wang JM, et al. Metabolomic and transcriptomic analyses provide insights into the role of MiMYB114 and MiMYC2 in the MeJA-induced regulatory network for mango pericarp coloration [J]. Int J Biol Macromol, 2025, 311: 143713.

[64] Chung MY, Vrebalov J, Alba R, et al. A tomato (*Solanum lycopersicum*) APETALA2/ERF gene, *SlAP2a*, is a negative regulator of fruit ripening [J]. Plant J, 2010, 64(6): 936-947.

[65] Lee JM, Joung JG, McQuinn R, et al. Combined transcriptome, genetic diversity and metabolite profiling in tomato fruit reveals that the ethylene response factor *SlERF6* plays an important role in ripening and carotenoid accumulation [J]. Plant J, 2012, 70(2): 191-204.

[66] Zhu KJ, Sun Q, Chen HY, et al. Ethylene activation of carotenoid biosynthesis by a novel transcription factor CsERF061 [J]. J Exp Bot, 2021, 72(8): 3137-3154.

[67] Wang X, Wang YP, Hao WH, et al. The molecular and metabolic mechanisms underlying the citrine/yellow coloration in the peels of the shiranui mandarin Citrus mutant [J]. Horticulturae, 2025, 11 (11): 1333.

[68] Yuan Y, Ren SY, Liu XF, et al. SlWRKY35 positively regulates carotenoid biosynthesis by activating the MEP pathway in tomato fruit [J]. New Phytol, 2022, 234(1): 164-178.

[69] Wang L, Zhang XL, Wang L, et al. Regulation of ethylene-responsive SlWRKYs involved in color change during tomato fruit ripening [J]. Sci Rep, 2017, 7: 16674.

[70] Chen HY, Ji HY, Huang WK, et al. Transcription factor CrWRKY42 coregulates chlorophyll degradation and carotenoid biosynthesis in citrus [J]. Plant Physiol, 2024, 195(1): 728-744.

[71] Ding WQ, Luo YS, Li WL, et al. Fine mapping and transcriptome profiling reveal CpAPRR2 to modulate immature fruit rind color formation in zucchini (*Cucurbita pepo*) [J]. Theor Appl Genet, 2024, 137(7): 167.

[72] Jeong HB, Jang SJ, Kang MY, et al. Candidate gene analysis reveals that the fruit color locus C1 corresponds to PRR2 in pepper (*Capsicum frutescens*) [J]. Front Plant Sci, 2020, 11: 399.

[73] Lee SB, Kim JE, Kim HT, et al. Genetic mapping of the c1 locus by GBS-based BSA-seq revealed Pseudo-Response Regulator 2 as a candidate gene controlling pepper fruit color [J]. Theor Appl Genet, 2020, 133(6): 1897-1910.

[74] Ma J, Dai JX, Liu XW, et al. The transcription factor CaBBX20 regulates capsanthin accumulation in pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Sci Hortic, 2023, 314: 111907.

[75] Xiong C, Luo D, Lin AH, et al. A tomato B-box protein SlBBX20 modulates carotenoid biosynthesis by directly activating PHYTOENE SYNTHASE 1, and is targeted for 26S proteasome-mediated degradation [J]. New Phytol, 2019, 221(1): 279-294.

[76] Pan C, Liao YF, Shi BJ, et al. Blue light-induced MiBBX24 and MiBBX27 simultaneously promote peel anthocyanin and flesh carotenoid biosynthesis in mango [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 219: 109315.

[77] Wang YG, Li XH, Qiu HX, et al. The MADS-RIPENING INHIBITOR-DIVARICATA1 module regulates carotenoid biosynthesis in nonclimacteric Capsicum fruits [J]. Plant Physiol, 2025, 197(2): kiaf013.

[78] Tantisuwanichkul K, Komaki S, Watanabe M, et al. Unveiling the regulatory role of DzAGL6-1 in carotenoid biosynthesis during durian (*Durio zibethinus*) fruit development [J]. Plant Cell Rep, 2024, 43(9): 217.

[79] Lu SW, Ye JL, Zhu KJ, et al. A fruit ripening-associated transcription factor CsMADS5 positively regulates carotenoid biosynthesis in citrus [J]. J Exp Bot, 2021, 72(8): 3028-3043.

[80] Zhu KJ, Chen HY, Mei XH, et al. Transcription factor CsMADS3 coordinately regulates chlorophyll and carotenoid pools in Citrus hesperidium [J]. Plant Physiol, 2023, 193(1): 519-536.

[81] Sun Q, He ZC, Ye JL, et al. A novel C2H2-type zinc-finger transcription factor, CitZAT4, regulates ethylene-induced orange coloration in Satsuma mandarin flavedo (*Citrus unshiu* Marc.) [J]. J Integr Plant Biol, 2025, 67(2): 294-310.

[82] Sun Q, He ZC, Wei RR, et al. Red peel regulator 1 links ethylene response factor 25 and β-citraurin biosynthetic genes to regulate ethylene-induced peel reddening in citrus [J]. Plant Cell, 2025, 37 (1): koaf010.

[83] Hou XM, Wang T, Li YH, et al. NaCl promotes tomato fruit coloring by relieving SlSR3-induced transcriptional inhibition of lycopene synthesis-related genes [J]. Plant J, 2025, 123(5): e70450.

[84] Sagawa JM, Stanley LE, LaFountain AM, et al. An R2R3-MYB transcription factor regulates carotenoid pigmentation in *Mimulus lewisii* flowers [J]. New Phytol, 2016, 209(3): 1049-1057.

[85] Meng YY, Wang ZY, Wang YQ, et al. The MYB activator WHITE PETAL1 associates with MtTT8 and MtWD40-1 to regulate carotenoid-derived flower pigmentation in *Medicago truncatula* [J]. Plant Cell, 2019, 31(11): 2751-2767.

[86] Li YQ, Bao TT, Zhang J, et al. The coordinated interaction or regulation between floral pigments and volatile organic compounds [J]. Hortic Plant J, 2025, 11(2): 463-485.

[87] Jian Y, Li YN, Liu HR, et al. SlBES1-mediated brassinosteroid signaling suppresses flavonoid biosynthesis in tomato fruit [J]. Plant Commun, 2025, 6(11): 101523.

[88] Yazdani M, Sun ZX, Yuan H, et al. Ectopic expression of *ORANGE* promotes carotenoid accumulation and fruit development in tomato [J]. Plant Biotechnol J, 2019, 17(1): 33-49.

[89] Gao YF, Zhou X, Huang HT, et al. ORANGE proteins mediate adaptation to high light and resistance to *Pseudomonas syringae* in tomato by regulating chlorophylls and carotenoids accumulation [J]. Int J Biol Macromol, 2025, 306: 141739.

[90] Wang PW, Wang YY, Wang WH, et al. Ubiquitination of phytoene synthase 1 precursor modulates carotenoid biosynthesis in tomato [J]. Commun Biol, 2020, 3: 730.

[91] Stanley LE, Ding BQ, Sun W, et al. A tetratricopeptide repeat protein regulates carotenoid biosynthesis and chromoplast development in monkeyflowers (Mimulus) [J]. Plant Cell, 2020, 32(5): 1536-1555.

[92] Reddy UK, Karnatam KS, Talavera-Caro A, et al. Uncovering the genetic architecture of pungency, carotenoids, and flavor in Capsicum chinense via TWAS-mGWAS integration and spatial transcriptomics [J]. Hortic Res, 2025, 12(12): uhaf243.

[93] Sarwar S, Sami A, Haider MZ, et al. Genome-wide identification and in silico expression analysis of CCO gene family in *Citrus clementina* (Citrus) in response to abiotic stress [J]. Plants, 2025, 14(2): 249.

[94] Koul A, Yogindran S, Sharma D, et al. Carotenoid profiling, in silico analysis and transcript profiling of miRNAs targeting carotenoid biosynthetic pathway genes in different developmental tissues of tomato [J]. Plant Physiol Biochem, 2016, 108: 412-421.

[95] Wang RF, de Maagd RA. Transcriptional control of tomato fruit development and ripening [J]. J Exp Bot, 2025, 76(21): 6311-6326.

[96] Zhong SL, Fei ZJ, Chen YR, et al. Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening [J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(2): 154-159.

[97] Chiou CY, Pan HA, Chuang YN, et al. Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in floral tissues of Oncidium cultivars [J]. Planta, 2010, 232(4): 937-948.

[98] Zou JJ, Cai X, Yang J, et al. DNA hypomethylation mediates flower opening and senescence in sweet osmanthus through auxin and ethylene responsive pathways [J]. Postharvest Biol Technol, 2023, 198: 112250.

[99] Guo JE, Hu ZL, Li FF, et al. Silencing of histone deacetylase SlHDT3 delays fruit ripening and suppresses carotenoid accumulation in tomato [J]. Plant Sci, 2017, 265: 29-38.

[100] He XQ, Liu KD, Wu Y, et al. A transcriptional cascade mediated by two APETALA2 family members orchestrates carotenoid biosynthesis in tomato [J]. J Integr Plant Biol, 2024, 66(6): 1227-1241.

[101] Huang BC, Li YC, Jia K, et al. The MdMYB44-MdTPR1 repressive complex inhibits MdCCD4 and MdCYP97A3 expression through histone deacetylation to regulate carotenoid biosynthesis in apple [J]. Plant J, 2024, 119(1): 540-556.

[102] Yang TX, Ali M, Lin LH, et al. Recoloring tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex gene editing [J]. Hortic Res, 2023, 10(1): uhac214.

（责任编辑　高洁）

生物技术通报
· 技术与方法 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):27-36

基于重测序的番茄全基因组InDel分子标记开发与应用

苏晓梅 刘淑梅 吕宏君 杨宗辉 侯丽霞*
（山东省农业科学院蔬菜研究所 农业农村部黄淮设施园艺工程重点实验室 山东省大宗露地蔬菜育种重点实验室，济南 250100）

摘 要： 【目的】开发覆盖番茄全基因组、多态性高且便于琼脂糖凝胶电泳检测的InDel分子标记，为番茄种质资源遗传多样性分析、DNA指纹图谱构建及品种鉴定等提供高效实用的技术工具。【方法】基于已公开的番茄重测序数据，通过生物信息学方法筛选符合目标的InDel变异位点并设计引物。利用涵盖普通鲜食番茄、口感番茄、加工番茄及樱桃番茄4大类型的商业品种，对所开发标记进行多态性验证、筛选与应用分析。【结果】成功开发84个在番茄全基因组均匀分布且多态性良好的InDel标记。利用该标记体系对288份番茄品种进行分析，结果显示品种间遗传相似系数变幅为0.369–0.994，平均值为0.667。基于遗传距离的聚类分析和主成分分析将供试番茄品种划分为4大类群，其中樱桃番茄表现出最高的遗传多样性并形成独立分支，普通鲜食番茄与口感番茄遗传背景最为相近，在聚类图中呈交叉混合分布。根据标记在不同类型番茄中的多态性差异，分别筛选出适用于普通鲜食番茄、口感番茄、加工番茄和樱桃番茄的核心鉴定标记组合，分别包含48、36、48和48对引物，并据此构建了品种DNA指纹图谱。应用案例表明，利用亲本间多态性标记可实现杂交种纯度的快速鉴定，利用核心标记组合可有效区分不同品种，证实了该标记体系的实用性与可靠性。【结论】开发的全基因组InDel标记体系多态性高、检测简便，能够有效揭示番茄商业品种的遗传多样性与群体结构，并成功应用于品种指纹图谱构建、真实性鉴定及杂交种纯度检测，可为番茄种质资源管理、分子育种及品种权保护提供技术支撑。

关键词： 番茄；InDel标记；群体结构；指纹图谱；品种鉴定；纯度鉴定；全基因组

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0100

Development and Application of Insertion-deletion (InDel) Markers in Tomato Based on Whole-genome Re-sequencing Data

SU Xiao-mei LIU Shu-mei LYU Hong-jun YANG Zong-hui HOU Li-xia*
(*Institute of Vegetables, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Huang Huai Protected Horticulture Engineering, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shandong Key Laboratory of Bulk Open-field Vegetable Breeding, Jinan* 250100)

Abstract: 【Objective】This study aims to develop a set of genome-wide, highly polymorphic insertion-deletion (InDel) markers that are easily detectable via conventional agarose gel electrophoresis, thereby providing efficient and practical technical tools for analyzing genetic diversity in tomato germplasm, constructing DNA fingerprint databases, and conducting cultivar identification. 【Method】Target InDel loci were screened from publicly available tomato resequencing data using bioinformatic methods, and primers were designed accordingly. The developed markers were validated, screened, and applied using commercial tomato varieties encompassing four major market types: fresh, flavor, processing and cherry tomatoes. 【Result】A total of 84 well-distributed and highly polymorphic InDel markers were successfully developed across the tomato genome. Analysis of 288 tomato varieties revealed pairwise genetic similarity coefficients ranging from 0.369 to 0.994, with an average of 0.667. Both cluster analysis and principal component analysis based on genetic distance consistently classified the tested varieties into four major genetic groups. Cherry tomatoes exhibited the highest genetic diversity and formed a distinct cluster, while fresh and flavor tomatoes shared the closest genetic background, showing overlapping patterns in the clustering. Considering the differential polymorphism of

收稿日期：2026-01-22
基金项目：山东省重点研发计划农业良种工程（2024LZGC006），东西部科技协作专项（25CXNA026），国家现代农业产业技术体系建设专项资金（CARS-23-G13）
*通信作者：侯丽霞 houlx2006@163.com

markers across tomato types, core marker sets for identification were refined for fresh, flavor, processing and cherry tomatoes, consisting of 48, 36, 48, and 48 primer pairs, respectively. DNA fingerprint profiles were subsequently constructed using these core sets. Case studies demonstrated that polymorphic markers between parental lines enabled rapid assessment of hybrid seed purity, and the core marker combinations effectively differentiated between varieties, confirming the practicality and reliability of this marker system.【Conclusion】The genome-wide InDel marker system exhibits high polymorphism and ease of detection. It effectively reveals the genetic diversity and population structure of commercial tomato varieties and has been successfully applied in varietal fingerprint construction, authenticity verification, and hybrid purity testing. This system provides technical support for tomato germplasm resource management, molecular breeding, and plant variety protection.

Keywords: tomato; InDel markers; population structure; fingerprint; variety identification; purity test; whole-genome

番茄（*Solanum lycopersicum* L.）是茄科（Solanaceae）茄属（*Solanum*）一年或多年生草本植物，起源于南美洲安第斯山脉地区[1]。因其果实营养丰富，现已成为全球广泛种植的重要蔬菜作物。根据联合国粮食及农业组织（FAO）的统计数据，2024年全球番茄年产量已达约1.88亿t，在蔬菜生产中位居首位。中国是全球最大的番茄生产国，产量约占世界总产量的1/3，同时也是重要的番茄育种与种子生产国。近年来，随着国内种业科技的快速发展，番茄育种水平显著提高，自主选育品种在生产中的应用比例持续上升[2]。在此背景下，实现番茄种质资源的科学管理与高效利用，已成为支撑产业可持续发展的关键。

准确、高效的品种鉴定是推动育种创新、保障种子品质、维护品种权人合法权益的重要基础。传统的鉴定方法主要依赖植株、叶片、果实等形态学性状，但这些性状易受环境条件与人为评估主观性的影响，导致同一品种在不同生长环境下可能表现明显的表型差异，影响鉴定结果的稳定性和可靠性。相比之下，基于分子标记的DNA指纹图谱技术具有遗传稳定性高、不受环境干扰、检测通量高等优势，已成为现代品种鉴定的重要辅助手段[3-7]。

随着高通量测序技术成本的不断下降，基于全基因组重测序开发的新型分子标记，如单核苷酸多态性（SNP）和插入/缺失（insertion-deletion, InDel）标记，得到了广泛应用。在基因组中，InDel标记的多态性频率仅次于SNP标记[8-9]，且可通过聚合酶链式反应（PCR）结合常规琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测，在分型简便性和实验成本上具有显著优势[9]。因此，InDel标记被视为在全基因组范围内开发实用分子标记的理想来源，已在番茄[10-11]、黄瓜[12-13]、辣椒[14-15]、茄子[16]、豇豆[17]、大白菜[18]等多种蔬菜作物的遗传研究与品种鉴定中发挥重要作用。然而，目前番茄中已报道的InDel标记数量有限，且已开发的标记大多基于几个至十几个碱基的微小片段差异，通常需借助分辨率更高的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳或高浓度琼脂糖凝胶电泳进行分离[10-11, 19]，这在一定程度上限制了其在常规育种实验室中的普及应用。因此，开发一套覆盖番茄全基因组、多态性高且便于通过常规琼脂糖凝胶电泳快速检测的InDel标记体系，对于提升番茄品种鉴定的效率与准确性、深化种质资源遗传评价以及支撑分子标记辅助育种实践，均具有重要的理论意义与应用价值。

本研究基于已公开发表的番茄重测序数据，通过生物信息学方法筛选并开发一套符合上述要求的InDel分子标记。利用该标记体系对288份代表性商业番茄品种进行系统的遗传多样性分析与群体结构解析，旨在阐明不同类型番茄的遗传分化特征，并验证该标记在品种真实性鉴定、杂交种纯度检测等实际育种环节中的应用效能，以期为番茄种质资源的科学管理、高效利用与育种创新提供可靠的技术支撑与理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料共288个番茄商业品种，来源于国内外不同育种单位和种子公司，包括普通鲜食番茄（B）、口感番茄（K）、加工番茄（P）、樱桃番茄（Y）4种类型，每种类型各72个品种。这些品种涵盖F_1杂交种和常规品种，广泛应用于商业化生产，具有较好的代表性。所有材料均于山东省农业科学院蔬菜研究所培养室内育苗，幼苗期室温控制在26-28 ℃。品种详细信息见附表1。

1.2　方法

1.2.1　基因组DNA提取　每个番茄品种随机选取5株单株，采集幼嫩叶片混合后，采用CTAB法提取基因组DNA。使用NanoDrop分光光度计检测DNA质量和浓度，确保A_{260}/A_{280}值在1.8–2.0之间，DNA浓度调整至30–50 ng/μL，-20 ℃保存备用。

1.2.2　InDel标记开发　基于公开发表的番茄重测序数据[20]，筛选符合目标条件的变异位点并设计引物。筛选条件如下：（1）插入/缺失碱基数为50–150 bp；（2）最小等位基因频率（minor allele frequency, MAF）>0.2；（3）多态性信息含量（polymorphism information content, PIC）>0.25；（4）位点基因型缺失率<10%，个体杂合率<15%。利用Perl语言自编脚本提取变异位点上、下游各300 bp的参考基因组碱基序列，利用Primer 5.0软件设计引物。设计参数为：引物长度18–24 bp，GC含量40%–60%，退火温度55–65 ℃，预期扩增产物大小100–300 bp。引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。

1.2.3　标记筛选及验证　每种类型番茄选取24个品种，以番茄基因组DNA为模板，对开发设计的标记进行验证和筛选。

PCR扩增体系为10 μL，包括DNA模板2 μL，2×Taq Master Mix 5 μL，上、下游引物（10 μmol/L）各0.25 μL，ddH_2O 2.5 μL。扩增程序为：94 ℃预变性3 min；94 ℃变性30 s，55 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，共32个循环；72 ℃延伸5 min，4 ℃保存。采用1.5%–1.8%琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物，用Bio-Rad凝胶成像系统采集图像。根据条带大小进行基因型判读，编码为：a（纯合参考型）、h（杂合型）、b（纯合变异型）及NA（未知）。

1.2.4　数据处理　使用R软件计算各标记的观测杂合度（observed heterozygosity, Ho）、期望杂合度（expected heterozygosity, He）、多态性信息含量（PIC）和次要等位基因频率（MAF）。采用基于状态一致性（identity by state, IBS）的方法计算品种间的遗传相似系数。基于此，进一步换算为遗传距离，公式为：遗传距离=1–遗传相似系数。基于遗传距离矩阵，采用非加权组平均法（unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA）构建系统发育树，使用R语言ggtree包进行树的可视化。对标准化后的基因型矩阵进行主成分分析（principal component analysis, PCA），使用R语言prcomp函数计算各主成分解释的变异百分比，并绘制PC1–PC2散点图。分别计算各类型内和类型间的平均遗传距离，并采用非参数检验评价差异显著性。以上所有统计分析和作图均在R 4.4.2环境中完成。

基于“用最少标记区分最多品种”的原则，用贪婪算法筛选核心InDel标记集。筛选过程从空标记集开始，在每一轮迭代中，选择能够使最多未区分品种对转变为可区分状态的标记加入核心标记集。品种对的区分判定标准为：两个品种在至少一个标记位点上的基因型不同即视为可区分，筛选过程持续迭代，直至所有品种对均可区分，或在剩余标记中已不存在能够进一步提高区分度的标记为止。

2　结果

2.1　标记的开发与筛选

根据筛选条件，全基因组范围内共检测到2 268个符合目标的InDel变异位点，平均每条染色体189个。其中4号染色体最多为490个，1号染色体最少，为118个。每条染色体选择分布相对均匀的10–12个位点设计成InDel引物，并利用4种不同类型番茄进行多态性验证和筛选。经过严格筛选和补充，共获得84个多态性不同的InDel标记，平均每条染色体7个。这些标记在染色体上的分布如图1所示，在不同类型番茄中的信息见附表2。

2.2　番茄遗传多样性分析和聚类分析

利用84个InDel标记对288个番茄品种进行基因型分析，计算各品种和各类型的遗传多样性参数和遗传距离（表1、表2）。总体而言，288个番茄品种的平均期望杂合度（He）为0.369 3，平均观测杂合度（Ho）为0.253 6。不同类型番茄中，樱桃番茄的遗传多样性最高，平均He为0.360 6，平均Ho为0.337 0，平均PIC为0.284 9，显著高于其他3种类型番茄。聚类分析结果表明，288份番茄品种主要划分为4大类群（图2），基本与番茄类型相对应，品种间遗传相似系数变幅为0.369–0.994，平均值为0.667。各类型内部遗传相似系数分别为：普通鲜食番茄（B）：0.589 3–0.970 2；口感番茄（K）：0.644 8–0.994；樱桃番茄（Y）：0.5–0.964 3；加工番茄（P）：

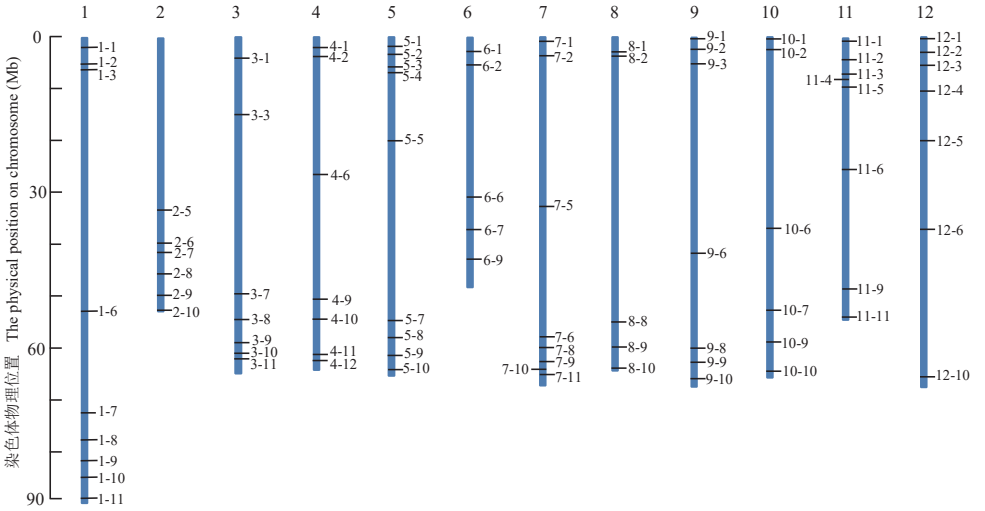


图1 84个InDel标记在番茄参考基因组的位置（SL4.0）

Fig. 1 Physical positions of 84 InDel markers on the tomato reference genome (SL4.0)

表1 不同类型番茄遗传多样性信息

Table 1 Genetic diversity parameters of different tomato types

群体类型 Group type	平均次要等位基因频率 Mean MAF	平均观测杂合度 Mean Ho	平均期望杂合度 Mean He	平均多态信息含量 Mean PIC
普通鲜食番茄 Fresh tomato（B）	0.207 4	0.254 8	0.264 0	0.208 8
口感番茄 Flavor tomato（K）	0.168 0	0.242 7	0.232 4	0.190 1
加工番茄 Processing tomato（P）	0.205 1	0.179 7	0.282 3	0.227 2
樱桃番茄 Cherry tomato（Y）	0.279 1	0.337 0	0.360 6	0.284 9
总计 Total	0.279 8	0.253 6	0.369 3	0.294 5

注：总体指标（总计）是基于288个品种整体重新计算各标记的MAF、Ho、He、PIC后取均值

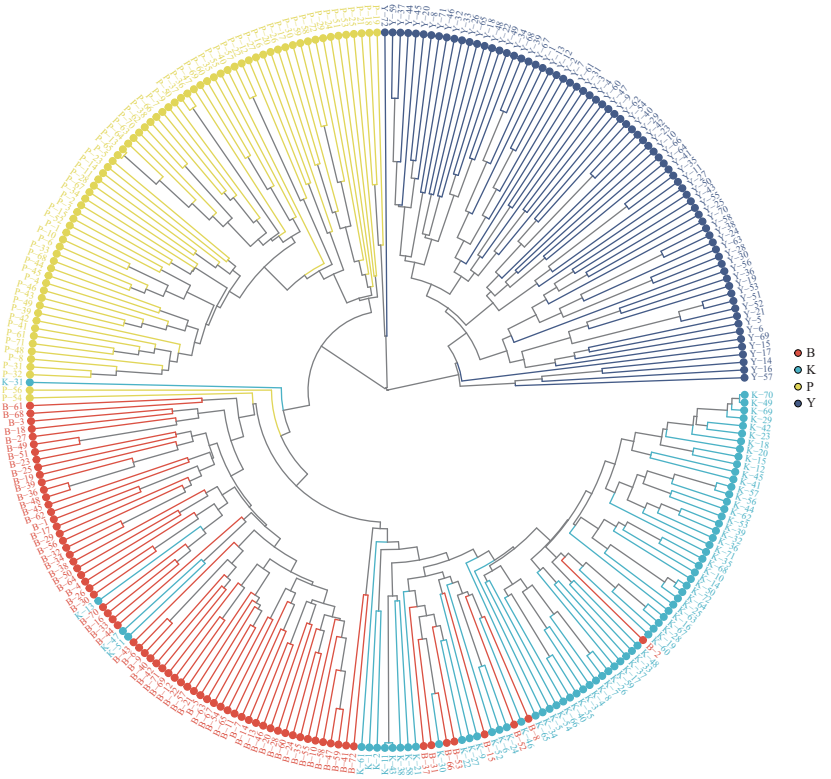
Note: The overall metrics (Total) were calculated as the mean values after recalculating the MAF, Ho, He, and PIC for each marker across all 288 varieties

表2 不同类型番茄间遗传距离矩阵

Table 2 Genetic distance matrix among different tomato types

群体类型 Group type	普通鲜食番茄 Fresh tomato（B）	口感番茄 Flavor tomato（K）	加工番茄 Processing tomato（P）	樱桃番茄 Cherry tomato（Y）
普通鲜食番茄 Fresh tomato（B）	0.213 2	—	—	—
口感番茄 Flavor tomato（K）	0.261 9	0.185 5	—	—
加工番茄 Processing tomato（P）	0.315 3	0.345 7	0.259 9	—
樱桃番茄 Cherry tomato（Y）	0.412 2	0.429 0	0.420 8	0.296 8

0.511 9–0.994，表明部分品种间遗传关系极为相近，可能为极相似品种。由表2可知，樱桃番茄与普通鲜食番茄、口感番茄、加工番茄的平均遗传距离分别为0.412 2、0.429 0和0.420 8，均明显高于其他类型间的遗传距离，这与PCA分析结果（图3）一致，进一步证实了樱桃番茄具有独特的遗传背景。此外，普通鲜食番茄与口感番茄的遗传距离最小，为0.261 9，显著低于其与樱桃番茄或加工番茄的遗传距离，且二者在系统发育树和PCA空间中存在明显重叠，表明二者具有相近的遗传关系。综上所述，本研究中开发的InDel标记能有效划分不同类型的番茄品种或种质资源，可用于遗传多样性分析。

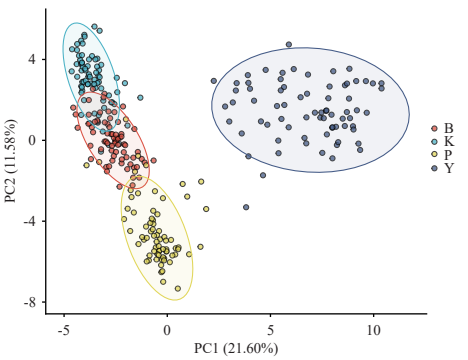


B:普通鲜食番茄;K:口感番茄;P:加工番茄;Y:樱桃番茄。下同

B: Fresh tomato. K: Flavor tomato. P: Processing tomato. Y: Cherry tomato. The same below

图2　基于84个InDel标记构建的288个番茄品种UPGMA系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree of 288 tomato varieties based on 84 InDel markers using the UPGMA method



PC1:解释21.60%的遗传变异;PC2:解释11.58%的遗传变异

PC1: Explained 21.60% of the total genetic variation; PC2: explained 11.58% of the total genetic variation

图3　基于84个InDel标记的288份番茄品种主成分分析(PCA)

Fig. 3　Principal component analysis (PCA) of 288 tomato varieties based on 84 InDel markers

2.3　InDel鉴定组合的筛选

基于“用最少标记区分最多品种”的原则，筛选出能够区分288份番茄品种所需要的最少引物数，一共为13对（图4），具体标记见附表2。

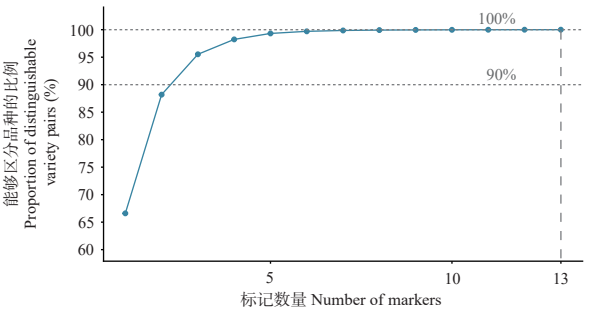
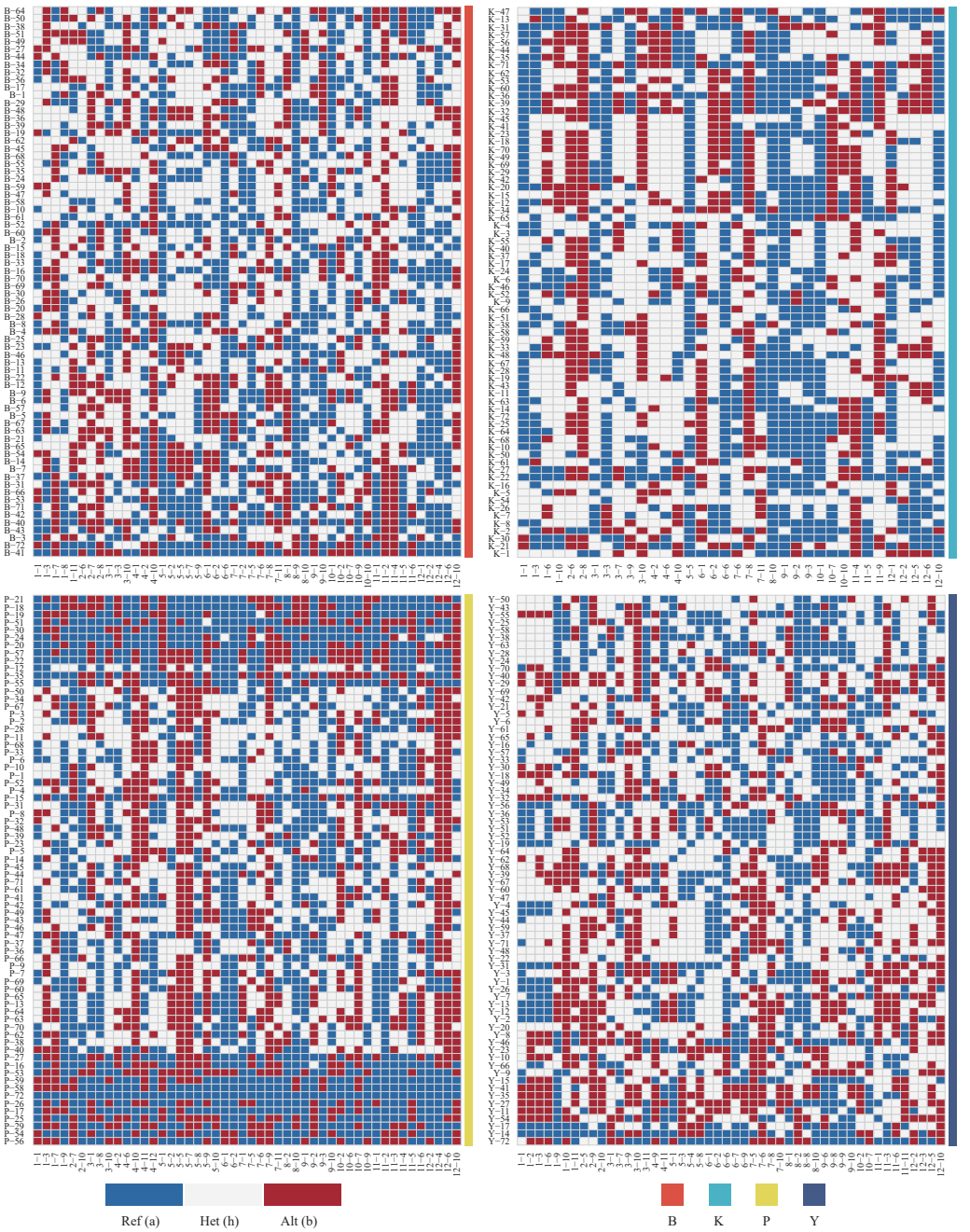


图4　InDel位点数对番茄品种的鉴定效率

Fig. 4　Efficiency of tomato variety identification using different numbers of InDel markers

鉴于标记多态性存在类型间差异，依据高PIC值、染色体均匀分布及非紧密连锁的原则，针对不同类

型番茄分别精简了核心标记组合。最终适用于鉴定普通鲜食番茄的核心标记为48对，口感番茄36对，加工番茄48对，樱桃番茄48对，所有标记信息详见附表2。利用这些核心标记组合能够有效区分不同番茄品种（图5），为番茄品种的鉴定提供了有效工具。



指纹图谱中不同颜色分别表示与参考基因组一致的纯合型(a,蓝色)、杂合型(h,白色)、纯合变异型(b,红色)

In the fingerprint, different colors represent the homozygous type consistent with the reference genome (a, blue), heterozygous type (h, white) and variant homozygous type (b, red), respectively

图5 基于核心标记的4种类型番茄指纹图谱

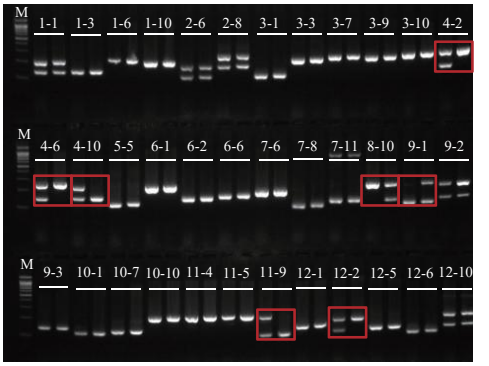
Fig. 5 DNA fingerprints of four tomato types based on core markers

2.4　InDel标记在番茄品种真实性鉴定中的应用

利用精简的标记组合对番茄品种真实性进行验证。以2个口感番茄品种‘高品1918’和‘高品2718’为材料，利用筛选获得的36对口感番茄核心标记进行分析，结果（图6）显示，在36个标记中有7个表现出差异，表明‘高品1918’和‘高品2718’为2个不同的番茄品种。以上结果表明，利用筛选的InDel核心标记组合可有效进行番茄品种真实性鉴定。

2.5　InDel标记在番茄杂交种纯度鉴定中的应用

以新品种‘品番1933’的亲本DNA为模板，对口感番茄核心标记组合进行多态性筛选，选取亲本间有差异的InDel标记对杂交种进行鉴定。在亲本间条带单一且具有多态性的标记共14对，随机选取其中条带清晰且位于不同染色体的3个标记，即标记1-10、标记3-9和标记11-5，对94株F_1进行鉴定（图7）。结果表明，除62号单株与母本基因型一致外，其他单株均具有双亲带型，杂交种纯度为98.94%。以上结果表明，InDel标记可用于番茄杂交种纯度的高效检测。

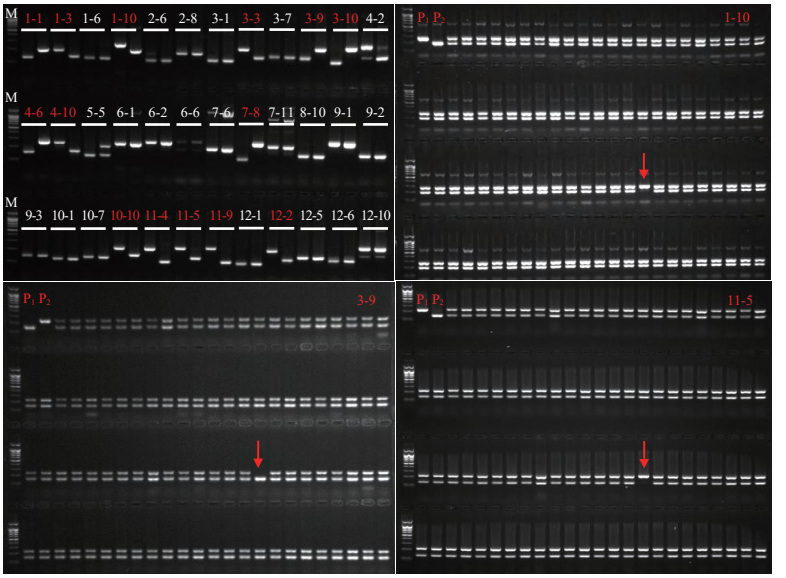


红框表示2个品种间具有差异的标记

The red box indicates polymorphic markers between the two varieties. M: 100 bp DNA marker

图6　基于36个核心标记的2个口感番茄品种真实性鉴定

Fig. 6　Authenticity identification of two flavor tomato varieties based on a core set of 36 markers



P_1：母本，P_2：父本；红色箭头表示杂株；红色数字表示可用于纯度鉴定的标记

P_1: The female parent. P_2: The male parent. The red arrows indicate the off-type plants. The red numbers indicate the markers that can be used for purity identification

图7　基于分子标记的‘品番1933’杂交种纯度鉴定

Fig. 7　Purity identification of the hybrid ‘Pinfan 1933’ based on molecular markers

3　讨论

3.1　InDel标记的开发策略与技术优势

InDel标记的开发主要依赖于全基因组重测序所揭示的序列变异。由于基因组同一位点发生不同长度插入/缺失变异的几率较小，开发过程中多态性位点相对较少[21]，这与SSR标记形成鲜明对比。因

此，InDel标记具有基因分型准确、遗传稳定、共显性遗传等特点[21-22]，尤其适用于品种鉴定和指纹图谱构建等对位点可靠性要求较高的应用场景。

番茄基因组中InDel变异虽然广泛存在，但多数仅为数个碱基的微小差异，难以通过常规琼脂糖凝胶电泳有效区分。为此，本研究将筛选目标聚焦于片段差异长度为50-150 bp的InDel位点，并通过不同类型番茄进行多态性筛选。本研究所开发的标记不仅具有较高的PIC值和良好的扩增稳定性，更重要的是其长度多态性可通过1.5%-1.8%琼脂糖凝胶电泳清晰分辨，大幅降低了技术操作门槛。与依赖聚丙烯酰胺凝胶电泳或荧光毛细管电泳的标记体系相比，本研究的InDel标记体系在基层育种单位和资源有限的实验室中更具推广性。

3.2 InDel标记在番茄遗传研究中的应用

本研究所构建的包含84个标记的InDel检测体系，主要用于种质资源遗传多样性评估与系统发育关系分析等常规育种实践。对于全基因组关联分析或基于连锁不平衡的遗传解析，通常需要数百甚至上千个标记[23]。但对于核心种质构建、品种真实性鉴定以及杂交亲本选配等常规育种实践，几十至百余个多态性高、分布均匀的标记已足以提供可靠的遗传信息[24-25]。本研究综合采用遗传距离计算、聚类分析、主成分分析等多种方法，结果相互印证，揭示了288份商业品种可分为4个主要遗传类群，其中樱桃番茄独立成支，而鲜食与口感番茄遗传背景高度重叠，证明该套标记在解析群体遗传结构方面可行有效。

更重要的是，该标记体系展现了良好的应用潜力。本研究针对鲜食、口感、加工、樱桃4大类型番茄分别优化出更具效率的专用鉴定组合，并构建了相应的DNA指纹图谱。应用案例验证表明，该体系可成功用于品种区分与杂交种纯度鉴定，为番茄品种DNA身份证构建、种子质量检测、育种材料知识产权保护提供了可行的技术方案。

3.3 番茄品种的遗传多样性特征

本研究中288份商业番茄品种的平均期望杂合度为0.369 3，处于中等水平，与国际上对现代栽培番茄多样性水平的评估一致，但明显低于番茄野生种及地方品种[26]。这种差异是人工驯化与高强度育种选择的直接反映：现代育种在提升目标性状的同时，也带来了遗传瓶颈效应，导致栽培种群的遗传基础趋于狭窄。不同育种目标的选择强度差异进一步塑造了类型间的遗传分化格局。加工番茄因育种目标高度集中于番茄红素含量高、果皮易脱、成熟一致等性状[27]，长期定向选择导致其遗传多样性降低，在聚类分析中形成相对独立的分支。与之相对，樱桃番茄表现出最高的遗传多样性，且形成了独立的系统发育分支，这与前人研究一致[28-30]。该特征归因于樱桃番茄育种过程中对野生种质的基因渗入，保留了更为丰富的遗传变异，为其丰富的果实形态和色泽变异提供了遗传基础[30-31]。

值得注意的是，普通鲜食番茄与口感番茄之间遗传相似度较高，在聚类分析和PCA中呈交叉混合分布。可能原因如下：其一，两者的市场分类主要依据风味、糖酸度等感官品质，这些性状可能由少数主效基因或QTL控制，未引起基因组背景的广泛分化；其二，口感番茄作为市场细分产物，其育种材料多源于鲜食品种的改良选育，两者间种质交流频繁；其三，风味评价具有一定主观性，其分类标准不如果实大小、颜色等形态性状客观明确。

本研究利用所开发的标记体系对番茄群体进行系统分析并探索其在育种中的应用潜力，结果表明该标记体系具有较好的应用价值。然而，本研究仍存在以下局限：其一，供试材料以商业品种为主，缺乏对野生种质及地方品种的系统覆盖，在一定程度上限制了遗传多样性解析的广度与深度；其二，所开发标记均为全基因组背景标记，尚未与具体性状建立直接关联。后续研究可结合表型数据进行标记-性状关联分析，以提升其在育种实践中的指导价值。

4 结论

基于番茄重测序数据，开发了一套覆盖全基因组、多态性高且便于琼脂糖凝胶电泳检测的InDel分子标记体系，利用该标记体系系统评价了供试番茄品种的遗传多样性和群体结构，同时验证了该套InDel标记在番茄育种中的应用效果，可为番茄种质资源及品种遗传多样性分析、DNA指纹图谱构建、杂交种纯度检测及品种真实性鉴定等方面提供参考。

文章所有附表请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/2026060117330 6_NewsFile_60.pdf）。

参考文献

[1] Blanca J, Montero-Pau J, Sauvage C, et al. Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions [J]. BMC Genom, 2015, 16: 257.

[2] 李君明, 项朝阳, 王孝宣, 等. “十三五”我国番茄产业现状及展望 [J]. 中国蔬菜, 2021(2): 13-20.
Li JM, Xiang CY, Wang XX, et al. Current situation of tomato industry in China during ‘the thirteenth Five-Year Plan’ period and future prospect [J]. China Veg, 2021(2): 13-20.

[3] 李剑, 谢昊, 豆丹丹, 等. DNA分子标记在作物品种鉴定中的应用展望 [J]. 安徽农业科学, 2026, 54(7): 5-9.
Li J, Xie H, Dou DD, et al. Prospects of DNA molecular markers in crop variety identification [J]. J Anhui Agric Sci, 2026, 54(7): 5-9.

[4] Zhang J, Ren J, Yang JJ, et al. Evaluation of SNP fingerprinting for variety identification of tomato by DUS testing [J]. Agric Commun, 2023, 1(1): 100006.

[5] 苏国钊, 李媛媛, 刘中华, 等. 苦瓜品种SSR分子标记鉴定技术体系构建与应用 [J]. 中国农业科学, 2024, 57(11): 2227-2242.
Su GZ, Li AA, Liu ZH, et al. Construction and application of SSR marker identification system for bitter gourd varieties [J]. Sci Agric Sin, 2024, 57(11): 2227-2242.

[6] 朱海峰, 王天鹏, 全瀚仪, 等. 基于KASP标记的芥菜种质资源分子身份证构建 [J]. 中国蔬菜, 2025(3): 34-45.
Zhu HF, Wang TP, Quan HY, et al. Construction of molecular identity card for mustard germplasm resources based on KASP markers [J]. China Veg, 2025(3): 34-45.

[7] 胡娜, 魏庆镇, 庞鸿涛, 等. 茄科作物DNA指纹图谱研究进展及其在遗传育种的应用 [J]. 中国蔬菜, 2025(10): 34-44.
Hu N, Wei QZ, Pang HT, et al. Research progress of DNA fingerprinting of Solanaceae crops and its application in genetic breeding [J]. China Veg, 2025(10): 34-44.

[8] 洪晓如, 吴智明, 陈汉才, 等. 基于重测序的芥蓝(*Brassica alboglabra*)全基因组InDel标记开发 [J]. 分子植物育种, 2021, 19(4): 1190-1201.
Hong XR, Wu ZM, Chen HC, et al. Development of InDel markers for *Brassica alboglabra* based on whole-genome re-sequencing data [J]. Mol Plant Breed, 2021, 19(4): 1190-1201.

[9] Zhang YY, Shi J, Shen CQ, et al. Discovery of DNA polymorphisms via genome-resequencing and development of molecular markers between two barley cultivars [J]. Plant Cell Rep, 2022, 41(12): 2279-2292.

[10] Jin L, Zhao LP, Wang YL, et al. Genetic diversity of 324 cultivated tomato germplasm resources using agronomic traits and InDel markers [J]. Euphytica, 2019, 215(4): 69.

[11] 张辉, 李鑫, 王志敏, 等. 基于核心InDel标记樱桃番茄种质资源的遗传多样性分析与应用 [J]. 中国蔬菜, 2023(10): 26-36.
Zhang H, Li X, Wang ZM, et al. Genetic diversity analysis and application of cherry tomato germplasm based on core InDel markers [J]. China Veg, 2023(10): 26-36.

[12] Adedze YMN, Lu X, Xia YC, et al. Agarose-resolvable InDel markers based on whole genome re-sequencing in cucumber [J]. Sci Rep, 2021, 11: 3872.

[13] Yang JC, Meng PX, Mi H, et al. The development of ideal insertion and deletion (InDel) markers and initial indel map variation in cucumber using re-sequenced data [J]. BMC Genom, 2025, 26: 391.

[14] Guo GJ, Zhang GL, Pan BG, et al. Development and application of InDel markers for *Capsicum* spp. based on whole-genome re-sequencing [J]. Sci Rep, 2019, 9: 3691.

[15] Qureshi M, Ulusoy D, Kasapoğlu S, et al. Novel InDel marker development in pepper (*Capsicum annuum* L.) by ddRADSeq [J]. Trop Plant Biol, 2025, 18: 83.

[16] 尤园园, 王帅, 方莹莹, 等. 茄子全基因组InDel变异特征及分子标记开发和应用 [J]. 园艺学报, 2024, 51(3): 520-532.
You YY, Wang S, Fang YY, et al. Variation characteristics of insertion-deletion (InDel) and molecular markers development and application in eggplant based on whole genome re-sequencing data [J]. Acta Hortic Sin, 2024, 51(3): 520-532.

[17] 杨易, 黎庭耀, 李国景, 等. 基于重测序的长豇豆基因组InDel标记开发及应用 [J]. 园艺学报, 2022, 49(4): 778-790.
Yang Y, Li TY, Li GJ, et al. Development and application of insertion-deletion (InDel) markers in asparagus bean based on whole genome re-sequencing data [J]. Acta Hortic Sin, 2022, 49(4): 778-790.

[18] Liu KW, Men WJ, Feng JX, et al. Development and application of InDels and SNPs markers based on whole-genome resequencing in Chinese cabbage [J]. Hortic Environ Biotechnol, 2025, 66(5): 1073-1088.

[19] Yang JJ, Wang YY, Shen HL, et al. In silico identification and experimental validation of insertion-deletion polymorphisms in tomato genome [J]. DNA Res, 2014, 21(4): 429-438.

[20] Zhou Y, Zhang ZY, Bao ZG, et al. Graph pangenome captures missing heritability and empowers tomato breeding [J]. Nature, 2022, 606(7914): 527-534.

[21] 杨洁, 赫佳, 王丹碧, 等. InDel标记的研究和应用进展 [J]. 生物多样性, 2016, 24(2): 237-243.
Yang J, He J, Wang DB, et al. Progress in research and application of InDel markers [J]. Biodivers Sci, 2016, 24(2): 237-243.

[22] Duan Y, Gan P, Lin QY, et al. Genetic diversity analysis and core marker identification of shanlan upland rice landraces using highly

informative InDel markers [J]. Agriculture, 2026, 16(1): 2.

[23] Porras-Hurtado L, Ruiz Y, Santos C, et al. An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings, and supporting software [J]. Front Genet, 2013, 4: 98.

[24] Wang Y, Wu XH, Li YW, et al. Identification and validation of a core single-nucleotide polymorphism marker set for genetic diversity assessment, fingerprinting identification, and core collection development in bottle gourd [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 747940.

[25] 田红丽, 杨扬, 范亚明, 等. 用于玉米品种真实性鉴定的最优核心SNP位点集的研发 [J]. 作物学报, 2024, 50(5): 1115-1123.
Tian HL, Yang Y, Fan YM, et al. Development of an optimal core SNP loci set for maize variety genuineness identification [J]. Acta Agron Sin, 2024, 50(5): 1115-1123.

[26] Wang T, Li HT, Zhu H, et al. Comparative analyses of genetic variation in a tomato (*Solanum lycopersicum* L.) germplasm collection with single nucleotide polymorphism and insertion-deletion markers [J]. Russ J Genet, 2019, 55(2): 204-211.

[27] Merk HL, Yarnes SC, Van Deynze A, et al. Trait diversity and potential for selection indices based on variation among regionally adapted processing tomato germplasm [J]. J Amer Soc Hort Sci, 2012, 137(6): 427-437.

[28] Phan NT, Kim MK, Sim SC. Genetic variations of F_1 tomato cultivars revealed by a core set of SSR and InDel markers [J]. Sci Hortic, 2016, 212: 155-161.

[29] Kim M, Jung JK, Shim EJ, et al. Genome-wide SNP discovery and core marker sets for DNA barcoding and variety identification in commercial tomato cultivars [J]. Sci Hortic, 2021, 276: 109734.

[30] Sim SC, Kim M, Chung SM, et al. Assessing the genetic variation in cultivated tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) using genome-wide single nucleotide polymorphisms [J]. Hortic Environ Biotechnol, 2015, 56(6): 800-810.

[31] Víquez-Zamora M, Vosman B, van de Geest H, et al. Tomato breeding in the genomics era: insights from a SNP array [J]. BMC Genom, 2013, 14: 354.

（责任编辑　高洁）

生物技术通报
· 技术与方法 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):37-46

基于复合菌的玉米芯发酵工艺构建与优化

陈文燕[1] 周瑞[1,2] 吴慧昊[1] 李耀东[1] 杨婕[1] 臧荣鑫[1*] 徐红伟[1*]
（1.西北民族大学生命科学与工程学院，兰州 730100；2.绿色牧业中心，兰州 730030）

摘 要： 【目的】高木质素秸秆因酸性洗涤木质素（acid detergent lignin, ADL）含量高导致饲料化利用率低。构建白腐真菌-枯草芽胞杆菌-毕赤酵母的复合菌发酵工艺，探究其协同降解玉米芯效果。【方法】以分离自香菇的白腐真菌BF-1为核心功能菌，搭配枯草芽胞杆菌、毕赤酵母构建三菌复合发酵体系（菌体量1∶1∶1），设BF-1单菌发酵为对照，均以玉米芯为基质。通过单因素试验（温度28-32 ℃、含水量40%-50%、接种量1%-5%）比较ADL降解效果，再用响应面法优化三菌体系发酵条件；结合扫描电镜观察玉米芯形态变化，测定粗蛋白（crude protein, CP）、中性洗涤纤维（neutral detergent fiber, NDF）、酸性洗涤纤维（acid detergent fiber, ADF）等指标，评价相对饲用价值（relative feed value, RFV）和相对饲用品质（relative feed quality, RFQ）。【结果】单因素试验表明，两种体系均在温度30 ℃、含水量45%、接种量3%时ADL降解效果最优，单菌发酵ADL降解率为42.29%，三菌发酵ADL降解率为58.83%，且三菌发酵降解效果显著优于单菌发酵（$P<0.01$）。响应面法优化三菌发酵最佳条件为温度29.8 ℃、含水量45.2%、接种量3.1%，此时ADL降解率达63.42%。发酵过程中，其Lac、MnP和LiP活性随时间持续升高。扫描电镜结果显示，三菌发酵后玉米芯表面结构破坏更明显，呈松散多孔特征；发酵21 d后，三菌体系玉米芯CP含量显著提升1.43%（$P<0.01$），NDF和ADF含量显著降低（$P<0.01$），其降解率分别为22.12%，33.97%，RFQ和RFV分别提高82.80%、17.21%。【结论】三菌协同发酵可高效降解玉米芯木质素，ADL降解率达63.42%，粗蛋白提升1.43%，纤维显著降解，相对饲用品质提高82.80%，饲用价值大幅提升，为玉米芯饲料化利用提供技术支撑。

关键词： 白腐真菌；玉米芯；酸性洗涤木质素；营养品质；饲用价值
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1369

Construction and Optimization of Corncob Fermentation Process Using Composite Microbial Inoculum

CHEN Wen-yan[1] ZHOU Rui[1,2] WU Hui-hao[1] LI Yao-dong[1] YANG Jie[1] ZANG Rong-xin[1*] XU Hong-wei[1*]
（1. *School of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou* 730100; 2. *Green Animal Husbandry Center, Lanzhou* 730030）

Abstract: 【Objective】 High-lignin straw exhibits low feed utilization efficiency due to its high content of acid detergent lignin (ADL). We developed a composite fermentation process using white-rot fungus, *Bacillus subtilis*, and *Pichia pastoris*, and evaluated its synergistic degradation effect in corncob. 【Method】 We constructed a three-strain composite fermentation system consisting of white-rot fungus BF-1 (isolated from *Lentinula edodes*) as the core functional strain, together with *Bacillus subtilis* and *Pichia pastoris* at a cell mass ratio of 1∶1∶1. Corncob served as the fermentation substrate, and single-strain fermentation of BF-1 was used as the control. The degradation efficiency of ADL was compared using single-factor experiments (temperature: 28-32 ℃, moisture content: 40%-50%, inoculum size: 1%-5%). Response surface methodology was then employed to optimize the fermentation conditions for the three-strain system. Morphological changes in corncobs were examined by scanning electron microscopy (SEM). Crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), and acid detergent fiber (ADF) were measured to evaluate the relative feed value (RFV) and relative feed quality (RFQ). 【Result】 Single-factor experiments showed that both fermentation systems achieved optimal ADL degradation at 30 ℃, 45% moisture content, and 3% inoculum size. Under these conditions, the

收稿日期：2025-12-15
基金项目：甘肃省现代寒旱特色农业科技支撑计划项目（KJZC-2025-12），甘肃省现代农业产业技术体系岗位专家项目（GSARS02），甘肃省科技计划项目（24ZDNA004，24YFWA016），西北民族大学中央高校基本科研业务费专项资金（31920250024）
*通信作者：臧荣鑫 rxzang2000@163.com，徐红伟 xuhongwei@xbmu.edu.cn

ADL degradation rate of single-strain fermentation was 42.29%, while that of the three-strain fermentation was 58.83%. The degradation efficiency of the three-strain system was significantly higher than that of the single-strain system (P<0.01). Response surface methodology identified the optimal conditions for three-strain fermentation as 29.8 ℃, 45.2% moisture, and 3.1% inoculum, achieving an ADL degradation rate of 63.42%. During fermentation, the activities of laccase (Lac), manganese peroxidase (MnP), and lignin peroxidase (LiP) increased continuously over time. Scanning electron microscopy revealed that after three-strain fermentation, the surface structure of the corncob was more significantly disrupted, exhibiting a loose and porous morphology. After 21 days of fermentation, the CP content in the three-strain system increased by 1.43% (P<0.01), while NDF and ADF contents decreased significantly (P<0.01), with degradation rates of 22.12% and 33.97%, respectively. RFQ and RFV increased by 82.80% and 17.21%, respectively. 【Conclusion】 The three-strain synergistic fermentation effectively degraded corncob lignin, achieving an ADL degradation rate of 63.42%, a 1.43% increase in CP content, and significant fiber degradation. RFQ was increased by 82.80%, and RFV was substantially enhanced. These findings provide a technical support for the utilization of corncobs as animal feed.

Keywords: white-rot fungi; corncob; acid detergent lignin; nutritional quality; feeding value

高木质素秸秆是重要的非常规饲料资源，因其酸性洗涤木质素（acid detergent lignin, ADL）紧密包裹营养成分，导致营养成分难以释放，饲料化利用率长期处于极低水平，严重限制了其在饲料领域的规模化应用[1]。我国作为农业大国，小麦秸秆、稻草、甘蔗渣等主要农作物秸秆年总产量超8亿t，这类秸秆的木质素含量占干重15%左右[2]。不仅阻碍牲畜对营养成分的消化吸收，导致这类高木质素秸秆的饲料化利用率低于30%，还限制了其资源化潜力的发挥[3]。因此，开发高效、绿色的木质素降解技术，破解木质素对秸秆营养组分包裹的难题，对于推动秸秆类资源的饲料化、高值化利用，缓解饲料资源短缺压力具有重要意义。

利用微生物发酵降解木质素是实现农业废弃物资源化利用的有效途径。其中，白腐真菌作为高效木质素降解微生物，因能分泌漆酶（Lac）、锰过氧化物酶（MnP）和木质素过氧化物酶（LiP）等特异性酶系，优先破坏木质素结构，被广泛应用于单一菌种发酵研究[4]。研究表明，牛奶菇（*Calocybe indica*）处理甘蔗渣56 d后，木质素降解率达49.3%，干物质体外消化率提升1.39倍[5]；白腐真菌处理啤酒糟后，其营养与功能特性显著改善[6]。特定的白腐真菌组合在固态发酵过程中能产生显著的协同效应[7]。这种效应并非简单的叠加，而是不同菌种在共享的固态基质上相互作用，可能通过信号交流、营养互补或生态位分化等方式，共同激活或强化了木质素降解酶系的合成途径[8]。实验证实，这种共培养策略比单一菌株的“单培养”更能有效提升相关酶的活性。此外，枯草芽胞杆菌也展现出一定的木质素降解潜力，从南海沉积物中分离的木质素芽胞杆菌L1（*Bacillus ligniniphilus* L1），以木质素为唯一碳源培养7 d，降解率约38.9%，同时其分泌的抗菌肽还能改善微生物生长环境[9]；毕赤酵母则可通过糖苷酶辅助分解半纤维素，产生有机酸、维生素等有益代谢产物，提升饲料适口性[10]。尽管单菌发酵研究已取得一定进展，但仍存在明显局限：白腐真菌虽能降解木质素，但微环境稳定性不足；枯草芽胞杆菌可稳环境，却对半纤维素分解能力弱[11]；毕赤酵母能补营养，却无直接降解木质素的能力[12-13]。Cui等[14]采用桦革褶菌与云芝复合培养，协同提升漆酶、锰过氧化物酶活性，最大酶活分别达18.06 U/mL和13.58 U/mL，较单菌培养均提高40%；复合菌群木质素降解率为50%，显著高于单菌桦革褶菌（26.6%）和云芝（37.2%）。Jiménez-Barrera等[15]将血红密孔菌（*Pycnoporus sanguineus*）和布氏白僵菌（*Beauveria brongniartii* ）共培养后，漆酶和锰过氧化物酶的活性分别增强了6倍和2.3倍，2种木质素降解菌联合培养同样能有效提高木质素降解率。近年来，复合菌发酵研究多聚焦于真菌与单一细菌的双菌组合，在功能互补性、协同降解效率及最终饲用品质提升方面的研究较为单一，特别是将具备完整木质素降解酶系的白腐真菌、具有环境调控与辅助降解功能的细菌以及擅长营养合成的酵母进行三方协同发酵的研究仍较缺乏，其协同机制、工艺优化及对玉米芯饲用价值的提升效果尚不明确。

因此，本研究复配白腐真菌、枯草芽胞杆菌与

毕赤酵母构建功能互补的三菌复合发酵体系，以玉米芯为发酵底物，优化其发酵条件，旨在破解高木质素秸秆饲料化降解效率低、营养品质差的核心难题，为高木质素秸秆非常规饲料资源开发利用提供新思路。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　样品来源　本试验所用菌种为白腐真菌BF-1（20252994）、枯草芽胞杆菌H-1（2024944）和毕赤酵母A1（M20253067），该菌种由西北民族大学生化与生物制药实验室培养与保存，玉米芯购买于兰州市榆中县。

1.1.2　主要试剂与仪器　主要试剂：酵母浸粉（大连美仑生物技术有限公司），木质素过氧化物酶活性检测试剂盒、漆酶活性检测试剂盒、锰过氧化物酶活性检测试剂盒（北京盒子生工科技有限公司）。

主要仪器：酶标仪（HBS-1096A，南京德铁实验设备有限公司），紫外分光光度计（UV-6000，上海元析仪器有限公司），立式压力蒸汽灭菌器（YXQ-LB-75S1，上海博迅医疗生物仪器股份有限公司），自动凯氏定氮仪（K9840，海能未来技术集团股份有限公司），热空气干燥箱（GRX-9203A，江苏正基仪器有限公司），石墨消解仪（SH220F，海能未来技术集团股份有限公司），扫描电子显微镜（EV018，Carl Zeiss AG, German），离子溅射镀膜仪（EM ACE600，武汉湛华科技有限公司）。

1.2　方法

1.2.1　菌株相容性试验　利用平板交叉划线法检测菌株间的相容性[16]。分别用接种环蘸取新鲜菌株，于PDA平板上交叉划线，28 ℃培养48 h后，观察各菌株的生长状况。

1.2.2　发酵试验菌种培养　单菌发酵：先将白腐真菌接种于PDA培养基中28 ℃培养72 h，使菌种处于良好的生长状态。复合菌发酵：将白腐真菌、枯草芽胞杆菌和毕赤酵母分别接种于PDA、LB和YPD培养基中28 ℃、37 ℃和30 ℃培养48 h，使菌种处于良好的生长状态。

1.2.3　玉米芯预处理　选取无霉变、无杂质的玉米芯，粉碎至1–3 mm粒径，确保颗粒大小均匀。将粉碎后的玉米芯按300 g、45%的比例加入蒸馏水，搅拌均匀后分装至发酵袋中；在121 ℃、0.1 MPa条件下灭菌20 min，灭菌后取出冷却至室温，备用。

1.2.4　复合菌液制备　分别取活化后的白腐真菌（PDA培养基培养于28 ℃，72 h，菌丝覆盖率达80%）、枯草芽胞杆菌（LB培养基37 ℃振荡培养24 h，菌液浓度达1.86×10^{11} CFU/mL）、毕赤酵母（YPD培养基28 ℃振荡培养24 h，菌液浓度达1.47×10^{8} CFU/mL），按体积比1∶1∶1的比例混合3种菌液，制备成复合菌液。

1.2.5　复合菌株降解酸性洗涤木质素条件优化

（1）单因素试验　通过改变温度（28 ℃、30 ℃、32 ℃），含水量（40%，45%，50%）和接种量（1%、3%、5%，v/v）3个因素，研究各因素对玉米芯发酵后酸性洗涤木质素含量及其降解率的影响。初始发酵培养基pH为7.0，密封发酵21 d后，检测发酵后玉米芯木质素降解率及营养品质，每个处理3个重复。

酸性洗涤木质素含量：参照杨斌等[17]方法将酸性洗涤纤维加入5 mL 72%硫酸中，在20 ℃消化3 h后过滤，并冲洗至中性。消化过程中溶解部分为纤维素，不溶解的残渣为酸性洗涤木质素和酸不溶灰分，将残渣烘干并灼烧灰化后称重，即可得出酸性洗涤木质素的含量。

（2）响应面试验　在单因素试验的基础上，使用软件Design Expert 13.0的Box-Behnken试验设计模型，选取温度（A）、含水量（B）和接种量（C）为自变量，以酸性洗涤木质素降解含量（Y）为响应值，采用3因素3水平的响应面法对发酵工艺进行优化，以确定最佳发酵工艺条件。Box-Behnken设计的因素与水平如表1所示。

表1　Box-Behnken设计的因素与水平

Table 1　Factors and levels of Box-Behnken design

因素 Factor	水平 Level		
温度 Temperature（℃）	28	30	32
含水量 Moisture content（%）	40	45	50
接种量 Inoculum size（%）	1	3	5

1.2.6　发酵玉米芯营养品质与饲用价值结果

（1）扫描电镜　参照王光荣等[18]方法将未发酵

的玉米芯原料与发酵后的玉米芯分别烘干、粉碎、过筛，用导电双面胶带固定在样品台上，在真空环境下进行镀金处理，物料表面形成一层导电膜后，用扫描电子显微镜观察玉米芯表面形态变化。

（2）木质素降解酶的酶活性测定　参照刘宽庆等[19]分别从7、14和21 d发酵袋中取样，用试剂盒测定酸性洗涤木质素降解过程中关键酶（漆酶、锰过氧化物酶、酸性洗涤木质素过氧化物酶）的活性。

（3）营养品质变化　参照杨航等[20]将原料和发酵后的玉米芯在65 ℃烘箱中干燥48 h直到恒重后，随即用粉碎机粉碎后，再用0.425 mm的筛子过筛。粗蛋白（crude protein, CP）采用凯氏定氮法测定；中性洗涤纤维（neutral detergent fiber, NDF）和酸性洗涤纤维（acid detergent fiber, ADF）采用Van Soest洗涤纤维素分析法[21-22]。

发酵后玉米芯的饲用价值采用相对饲用价值（relative feeding value, RFV）和相对饲用品质（relative feeding quality, RFQ）来体现，其饲用价值通过总消化养分（total digestible nutrients, TDN），干物质采食量（dry matter intake, DMI）来计算[23]。

$$DMI=120/NDF$$

$$RFQ=(TDN\times DMI)/1.23$$

$$RFV=[87.8-(0.7\times ADF)]\times(120/NDF)$$

1.2.7　数据处理

使用Excel软件对数据进行整理，使用SPSS 27软件进行单因素方差分析，采用邓肯法进行事后检验。柱状图显著性差异分析使用Origin 2021软件。

2　结果

2.1　单因素试验结果

由表2可知，单菌处理组在温度30 ℃，含水量45%，接种量3%时，ADL含量最低（$P<0.01$），分别为3.33%、4.42%和3.36%，其ADL降解率分别为42.29%、23.34%和41.83%。三菌处理组在温度28、30、32 ℃时，酸性洗涤木质素（ADL）含量均低于对照组，且30 ℃时ADL含量最低为2.69%（$P<0.01$）。温度30 ℃时ADL降解率最高为53.40%（$P<0.01$），与其他组相比降解效果显著。含水量40%、45%、50%的水平下，ADL含量均低于对照组，且45%含水量时ADL含量最低为2.38%（$P<0.01$），ADL降解率最高为58.83%（$P<0.01$），与其他组相比降解效果显著。接种量为1%、3%、5%时，ADL含量均低于对照组，且3%接种量时ADL含量最低为2.57%（$P<0.01$），ADL降解率最高为55.42%（$P<0.01$），与其他组相比降解效果显著。表明温度30 ℃、含水量45%、接种量3%为适宜发酵参数，

表2　单菌/复合菌对ADL含量及降解率的影响

Table 2　Effects of single/composite bacteria on ADL content and degradation rate (%)

因素 Factor	水平 Level	对照组 Control group	单菌处理组 Single-bacteria treatment group		三菌处理组 Three-bacteria treatment group		*P*-value
		ADL含量	ADL含量	ADL降解率	ADL含量	ADL降解率	
温度	28 ℃	5.77±0.41A	4.9±0.22B	15.02±3.86b	4.65±0.1B	19.35±1.8a	<0.01
	30 ℃	5.77±0.41A	3.33±0.11B	42.29±1.93b	2.69±0.1B	53.4±1.72a	<0.01
	32 ℃	5.77±0.41A	5.14±0.09B	10.98±1.57b	4.31±0.1B	25.31±1.69a	<0.01
含水量	40%	5.77±0.41A	5.34±0.12BC	7.45±2b	3.74±0.6B	32.29±1.15a	<0.01
	45%	5.77±0.41A	4.42±0.2B	23.34±3.49b	2.38±0.07B	58.83±1.24a	<0.01
	50%	5.77±0.41A	5.27±0.14B	8.61±2.47b	4.14±0.67B	36.24±1.78a	<0.01
接种量	1%	5.77±0.41A	5.16±0.17B	10.63±2.86b	4.7±0.17B	18.48±2.91a	<0.01
	3%	5.77±0.41A	3.36±0.16B	41.83±2.8b	2.57±0.09C	55.42±1.54a	<0.01
	5%	5.77±0.41A	4.46±0.23B	22.76±3.95b	3.88±0.07C	32.78±1.27a	<0.01

注：对照组为玉米芯原料。同行数据不同大写字母表示ADL含量在不同组间差异极显著（$P<0.01$）；不同小写字母表示ADL降解率在不同组间差异极显著（$P<0.01$），下同

Note: The control group consists of corncob raw materials. Different capital letters in the same row indicate extremely significant differences in ADL content among different groups ($P<0.01$); while different lowercase letters indicate extremely significant differences in ADL degradation rate among different groups ($P<0.01$), the same below

且白腐真菌与枯草芽胞杆菌、毕赤酵母复配存在显著协同作用，可大幅提升ADL降解效率。

2.2　三菌相容性试验结果

由图1可知，将白腐真菌、枯草芽胞杆菌和毕赤酵母进行平板共培养后，可见各菌株的菌落在培养基中无明显抑菌圈形成，菌丝与菌落相互接触后仍能正常扩展生长，未出现菌落边缘抑制、菌丝自溶或生长停滞等拮抗现象，表明这三株菌在该培养条件下具有良好的生长相容性，因此可以共同培养制成复合菌剂。



图1　菌株间相容性检测

Fig. 1　Compatibility test between strains

2.3　复合菌响应面试验结果

根据单因素试验结果，选取温度、含水量和接种量为影响因素，ADL降解率为响应面指标，采用响应面试验设计对三菌发酵玉米芯条件进一步优化，试验结果见表3。

采用Design Expert 13.0软件对酸性洗涤木质素降解率（Y）进行多元回归拟合分析，得到回归模型：Y（%）=56.97−6.84A−19.69B+7.63C−0.075 1AB−1.42AC−6.59BC−15.97A^2−23.15B^2− 20.28C^2。

对二次模型进行方差和显著性分析，结果见表4。采用Design Expert 13.0对三菌协同发酵玉米芯的酸性洗涤木质素降解率进行回归分析，结果表明模型极显著（P<0.000 1），决定系数R^2达0.984 4，失拟项不显著（P=0.848 5），拟合效果优异且预测准确。一次项中，接种量（C）极显著（P=0.006 3）、温度（A）和含水量（B）显著（P<0.05）影响降解率，其中接种量与降解率正相关，温度和含水量呈负相关；二次项A^2、B^2、C^2均极显著（P<0.000 1），说明各因素与降解率间存在非线性关系。交互项中仅BC（含水量×接种量）接近显著（P=0.080 8），其余交互作用不显著。因素影响程度排序为接种量>温度>含水量。

表3　响应面法试验结果

Table 3　Results of response surface methodology experiment

试验号 Test number	温度 Temperature (℃)	含水量 Water content (%)	接种量 Inoculum concentration (%)	ADL降解率 ADL degradation rate (%)
1	32	40	3	31.715 8
2	28	45	1	19.041 0
3	30	40	1	17.758 5
4	32	50	3	32.697 9
5	30	45	3	58.555 7
6	32	45	1	8.798 38
7	32	45	5	27.695 0
8	30	40	5	46.314 3
9	28	40	3	45.782 8
10	30	50	1	30.202 2
11	30	45	3	65.719 2
12	30	45	3	62.224 1
13	30	50	5	45.574 8
14	28	45	5	43.599 1
15	30	45	3	62.911 6
16	28	50	3	46.915 1
17	30	45	3	55.742 3

对温度（A）、含水量（B）和接种量（C）进行响应面交互作用分析，结果显示（图2），各因素交互作用对降解率的影响呈先升后降的抛物线趋势，存在最优响应顶点。当接种量固定时，温度与含水量组合降解率变化平缓，交互作用弱；含水量固定时，温度与接种量的交互作用不显著；温度固定时，含水量与接种量的交互作用接近显著，且三者交互作用影响顺序为BC>AC>AB。

三菌协同发酵玉米芯的最佳条件为温度29.8 ℃、含水量45.2%、接种量3.1%，验证试验中ADL降解率测定值为63.42%，与预测值65.72%的误差率为3.50%，因此，最佳发酵条件为30 ℃、45%含水量和3%接种量。

2.4　木质素降解酶的酶活性变化

由图3可知，三菌协同发酵玉米芯过程中，漆酶（Lac）、锰过氧化物酶（MnP）和木质素过氧化

表4 木质素降解率回归模型分析

Table 4 Regression model analysis of lignin degradation rate

方差来源 Variance source	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方差 Mean square	F值 F value	*P*-value	显著性 Significance
模型 Model	4 614.81	9	512.76	49.08	<0.000 1	**
A-温度	124.81	1	124.81	11.95	0.010 6	*
B-含水量	90.19	1	90.19	8.63	0.021 8	*
C-接种量	155.13	1	155.13	14.85	0.006 3	**
AB	0.005 6	1	0.005 6	0.000 5	0.982 1	
AC	8.01	1	8.01	0.767 0	0.410 2	
BC	43.45	1	43.45	4.16	0.080 8	
A^2	1 073.31	1	1 073.31	102.73	<0.000 1	**
B^2	141.00	1	141.00	13.50	0.007 9	**
C^2	1 731.93	1	1 731.93	165.78	<0.000 1	**
残差	73.13	7	10.45			
失拟项	12.09	3	4.03	0.264 2	0.848 5	no significance
纯误差	61.04	4	15.26			
总变异	4 687.94	16				
R^2					0.984 4	
R^2_{Adj}					0.964 3	
R^2_{Pre}					0.938 4	
Adeq precision					21.201 5	
CV（%）					7.84	

注：** 差异极显著（P<0.01）；* 差异显著（P<0.05）

Note: ** indicates extremely significant difference (P<0.01); * indicates significant difference (P<0.05)

物酶（LiP）的酶活随着时间的延长逐渐递增，不同时期Lac活性分别为1.27、1.63和1.73 U/L，MnP活性分别为12.71、15.47和22.39 U/L，Lip活性分别为3.42、6.06和9.7 U/L。表明三菌协同为木质素降解酶的合成分泌提供了稳定环境，持续升高的酶活性是复合菌体系高效降解ADL的关键酶学基础。

2.5 发酵前后玉米芯表面形态结构变化

未发酵的玉米芯表面光滑，结构紧密且完整（图4-A），而发酵玉米芯表面粗糙，空隙变大（图4-B–D），菌体孢子覆盖、夹杂在玉米芯细胞中，玉米芯致密完整的结构被破坏，且发酵时间越长结构破损越明显。证明三菌复合发酵能有效降解，松散多孔的结构为菌株代谢和营养成分释放创造了有利条件。

2.6 发酵玉米芯的营养指标变化

由表5可知，随发酵时间延长，玉米芯粗蛋白（CP）含量呈显著上升趋势，玉米芯原料粗蛋白含量为2.80%，发酵7、14、21 d后分别为4.69%、5.95%、6.79%，发酵21 d时增长率达142.50%，显著高于对照组。酸性洗涤纤维（ADF）与中性洗涤纤维（NDF）含量随发酵时间延长持续降低，玉米芯原料ADF为43.57%、NDF为78.31%，发酵21 d后分别降至28.77%、60.99%，降解率分别达到33.97%、22.12%。饲用价值方面，玉米芯原料相对饲用品质（RFQ）为56.22、相对饲用价值（RFV）为41.07，发酵至21 d时分别达到102.77和48.14，较玉米芯原料分别提升82.80%、17.21%。结果表明，三菌协同发酵可有效降解纤维类抗营养因子，提高粗蛋白含量，显著改善玉米芯的营养品质与饲用价值。

3 讨论

近年来，复合菌发酵研究多聚焦真菌与单一细菌的双菌组合，在功能互补性、协同降解效率及最终饲用品质提升方面的研究比较单一，特别是将具备完整木质素降解酶系的白腐真菌、具有环境调控与辅助降解功能的细菌以及擅长营养合成的酵母进行三方协同发酵的研究仍较缺乏，其协同机制、工

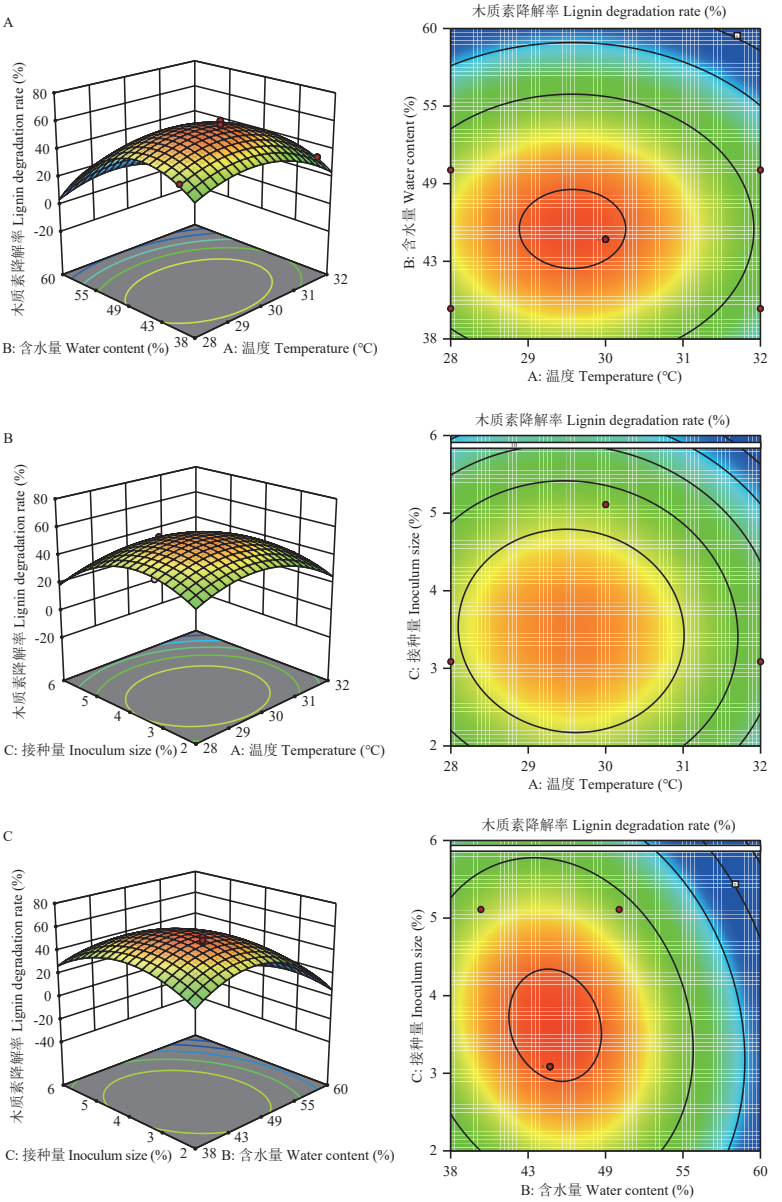


图2　两因素交互影响木质素降解率的响应面

Fig. 2　Response surface for the interactive effects of two factors on the lignin degradation rate

艺优化及对玉米芯饲用价值的提升效果尚不明确。因此，本研究旨在破解高木质素秸秆饲料化降解效率低、营养品质差的核心难题，为高木质素秸秆非常规饲料资源开发利用提供新思路。

菌株相容性是复合发酵体系稳定运行的核心，本研究证实白腐真菌BF-1、枯草芽胞杆菌与毕赤酵母三菌共培养无拮抗，与Sun等[24]真菌–细菌共生特性一致，为功能互补奠定基础。现有研究中，单菌发酵存在明显短板：白腐真菌虽能降解木质素但微环境稳定性差，枯草芽胞杆菌可抑菌却无木质素降解能力，毕赤酵母仅能分解半纤维素且缺乏降解核心功能[25-26]；而传统复合发酵多聚焦白腐真菌双菌共培养，无法实现降解与提升营养全功能覆盖[27]。本研究突破这一局限，首次构建三菌功能互补复合体系，实现三方协同代谢：白腐真菌为核心分泌Lac、MnP、LiP降解木质素，枯草芽胞杆菌

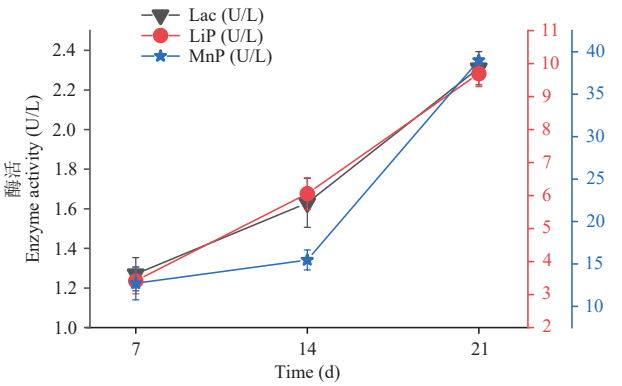
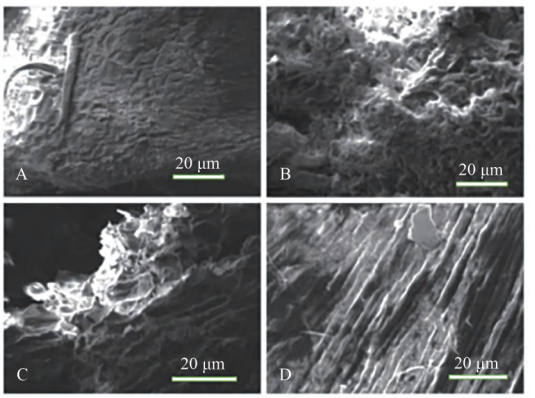


图3 反应时间对木质素降解酶活性变化的影响

Fig. 3 Influence of reaction time on changes in lignin-degrading enzyme activities



A:玉米芯原料;B:玉米芯发酵20 d;C:玉米芯发酵45 d;D:玉米芯发酵60 d

A: Raw corncob; B: corncob fermented for 20 days; C: corncob fermented for 45 days; D: corncob fermented for 60 days

图4 发酵前后的玉米芯扫描电镜结果

Fig. 4 Scanning electron microscopy results of corn cobs before and after fermentation

分泌抗菌肽稳定微环境，毕赤酵母分解半纤维素并调节pH促进酶活稳定。发酵中三种酶活持续升至1.73、22.39和9.7 U/L，无单菌发酵的酶活下降，成为ADL降解率达63.42%（显著高于单菌42.29%）的关键酶学基础，该结果与Niu等[28]多菌复合发酵中菌株功能互补、酶活协同提升的研究结论一致，也印证了Zhang等[29]提出的真菌–细菌–酵母多菌种组合可弥补单菌功能缺陷、提升木质素降解效率的相关观点，也丰富了复合发酵协同机制理论，为功能互补型菌剂构建提供新思路。

发酵工艺优化方面，本研究通过单因素试验确定30 ℃、45%含水量、3%接种量的适宜条件，契合菌株生长特性；再经响应面法优化确定29.8 ℃、45.2%含水量、3.1%接种量的最佳工艺，验证ADL降解率与预测值误差仅3.50%，模型拟合度R^2=0.984 4，可靠性与蔡吉等[30]研究相当。相较于夏欣欣等[31]双菌未优化工艺研究，本研究明确接种量>温度>含水量的因素影响顺序，得到可直接应用的简化工艺，解决了现有研究工艺模糊、难以产业化的问题。扫描电镜显示发酵后玉米芯表面粗糙多孔，与Xu等[32-33]木质素降解破坏秸秆结构的机制一致，直观印证降解效果。

高木质素秸秆饲用效率低的核心是木质素包裹营养、粗纤维高且粗蛋白不足，传统复合发酵多仅聚焦木质素降解。本研究通过三菌协同实现一体化营养调控：发酵21 d后玉米芯CP含量从2.80%升至6.79%，NDF、ADF降解率达22.12%、33.97%，RFQ、RFV分别提升82.80%、17.21%，效果优于

表5 发酵时间对玉米芯营养指标及饲用价值的影响

Table 5 Effects of fermentation time on nutritional indices and feed value of corncob (%)

组别 Group	对照组 Control group	发酵时间 Fermentation time (d)			*P*-value
		7	14	21	
粗蛋白(CP)	2.8±1.14C	4.69±0.62B	5.95±0.29A	6.79±0.44A	<0.001
CP增长率		0.68±0.22C	1.13±0.1B	1.43±0.16A	<0.001
酸性洗涤纤维(ADF)	43.57±1.16A	38.19±0.4B	35.67±1.98C	28.77±1.08D	<0.001
ADF降解率		12.36±0.92C	18.13±4.55B	33.97±2.47A	<0.001
中性洗涤粗纤维(NDF)	78.31±1.37A	68.13±1.36B	66.56±0.51B	60.99±1.83C	<0.001
NDF降解率		13.01±1.73C	15.01±0.65B	22.12±2.33A	<0.001
相对饲用品质(RFQ)	56.22±2.7D	74.55±0.76C	81.07±4.06B	102.77±3.5A	<0.001
相对饲用价值(RFV)	41.07±0.73B	40.7±1.44B	42.79±2.38B	48.14±2.04A	<0.001

Tuyen等[34]、杜云龙等[35]研究。其中白腐真菌降解木质素释放营养，枯草芽胞杆菌与毕赤酵母合成菌体蛋白提升CP，三菌酶系协同降解抗营养因子，实现多目标同步调控，为高木质素秸秆饲料化提供可复制模式。

综上，本研究构建白腐真菌、枯草芽胞杆菌与毕赤酵母跨菌属三菌复合发酵体系，突破单菌及传统双菌发酵局限，为高木质素秸秆饲料化利用提供新技术路径。该体系形成真菌–细菌–酵母跨界功能互补的协同代谢模式，丰富了复合微生物降解木质素的协同机制理论；通过分步优化确定标准化发酵工艺，明确各因素作用顺序，解决了现有研究工艺模糊、难以产业化的问题；打破单一木质素降解目标，实现木质素降解与饲料营养品质提升的一体化调控，形成秸秆饲料化营养优化的可复制模式。本研究仅完成体外工艺优化与营养评价，尚未开展动物体内饲喂试验，未验证其对动物生产性能、养分消化的实际效果，也未探究对肠道微生态的调控作用。后续将开展动物饲喂试验，结合分子生物学技术解析其对肠道菌群的调控效应，完善饲用价值评价体系，为该技术在畜牧养殖中的规模化应用提供全面的理论与数据支撑。

4　结论

构建以白腐真菌、枯草芽胞杆菌和毕赤酵母为核心的三菌复合发酵体系，最佳发酵条件为温度30 ℃、含水量45%、接种量3%，发酵21 d后，玉米芯ADL降解率达63.42%，显著优于白腐真菌单菌降解效果（42.19%）。发酵过程中，3种木质素降解酶活性持续提升，玉米芯致密结构被破坏形成多孔形态，同时CP含量显著增加，NDF和ADF含量大幅降低，RFQ和RFV分别提高82.80%和17.21%，营养品质与饲用价值得到全面提升。

参考文献

[1] Zeko-Pivač A, Bošnjaković A, Planinić M, et al. Improvement of the nutraceutical profile of brewer's spent grain after treatment with *Trametes versicolor* [J]. Microorganisms, 2022, 10(11): 2295.

[2] 李森, 罗霄天, 秦心儿, 等. 高粱秸秆栽培大球盖菇的品质、产量与优势分析 [J]. 生物资源, 2024, 46(1): 32-38.
Li S, Luo XT, Qin XE, et al. Analysis of quality, yield and advantages of *Stropharia rugosoannulata* cultivated with sorghum straw [J]. Biotic Resour, 2024, 46(1): 32-38.

[3] Nazar M, Tian JP, Wang X, et al. Effect of biological lignin depolymerization on rice straw enzymatic hydrolysis, anerobic fermentation characteristics and *in vitro* ruminal digestibility [J]. Int J Biol Macromol, 2025, 305: 141664.

[4] Liu WX, Zhao MY, Li MX, et al. Laccase activities from three white-rot fungal species isolated from their native habitat in North China using solid-state fermentation with lignocellulosic biomass [J]. BioResources, 2022, 17(1): 1533-1550.

[5] Ahmad Khan N, Khan M, Sufyan A, et al. Biotechnological processing of sugarcane bagasse through solid-state fermentation with white rot fungi into nutritionally rich and digestible ruminant feed [J]. Fermentation, 2024, 10(4): 181.

[6] 杨莉, 杨义, 郑碧君, 等. 木质素降解菌的筛选及其对酒糟的预处理研究 [J]. 生物质化学工程, 2024, 58(5): 45-52.
Yang L, Yang Y, Zheng BJ, et al. Screening of lignin-degrading fungal strain and its pretreatment of distillers' grains [J]. Biomass Chem Eng, 2024, 58(5): 45-52.

[7] Singh J, Mandal A, Nandabalan YK. Synergistic effect on lignolytic enzyme production through co-culturing of white rot fungi during solid state fermentation of agricultural residues [J]. Bull Natl Res Cent, 2025, 49: 3.

[8] Campos AO, Asevedo EA, Souza Filho PF, et al. Extraction of cellulases produced through solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* CCT-2768 using green coconut fibers pretreated by steam explosion combined with alkali [J]. Biomass, 2024, 4(1): 92-106.

[9] Zhu DC, Zhang PP, Xie CX, et al. Biodegradation of alkaline lignin by *Bacillus ligniniphilus* L1 [J]. Biotechnol Biofuels, 2017, 10: 44.

[10] Naranjo CA, Jivan AD, Vo MN, et al. Role of *BGS13* in the secretory mechanism of *Pichia pastoris* [J]. Appl Environ Microbiol, 2019, 85(24): e01615-e01619.

[11] Arora D, Sharma A, Singh S, et al. The Bacterial degradation of lignin—a Review [J]. Crit Rev Biotechnol, 2010, 30(4): 326-341.

[12] Hardianto D, Safarrida A, Prayoga GS, et al. Increasing the production of insulin glargine in *Pichia pastoris* through medium modification [J]. BIO Web Conf, 2024, 127: 06001.

[13] 李强, 吴晓青, 张新建. 微生物降解秸秆木质素的研究进展 [J]. 微生物学报, 2023, 63(11): 4118-4132.
Li Q, Wu XQ, Zhang XJ. Research progress in microbial degradation of straw lignin [J]. Acta Microbiol Sin, 2023, 63(11): 4118-4132.

[14] Cui TW, Yuan B, Guo HW, et al. Enhanced lignin biodegradation by consortium of white rot fungi: microbial synergistic effects and product mapping [J]. Biotechnol Biofuels, 2021, 14: 162.

[15] Jiménez-Barrera D, Chan-Cupul W, Fan ZL, et al. Fungal co-culture increases ligninolytic enzyme activities: statistical optimization

using response surface methodology [J]. Prep Biochem Biotechnol, 2018, 48(9): 787-798.

[16] 司欣雨, 李佳琪, 周梦含, 等. 多功能复合菌剂的构建及盐碱胁迫下促生效果 [J]. 农业工程学报, 2024, 40(21): 82-90.
Si XY, Li JQ, Zhou MH, et al. Constructing multifunctional composite microbial agents for promoting crop growth under saline-alkali stress [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2024, 40(21): 82-90.

[17] 杨斌, 殷引, 张浩博, 等. 洗涤剂法测定烟草及烟草制品中中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、酸性洗涤木质素的研究 [J]. 中国烟草学报, 2012, 18(3): 10-15.
Yang B, Yin Y, Zhang HB, et al. Determination of NDF, ADF and ADL in tobacco and tobacco products with detergent method [J]. Acta Tabacaria Sin, 2012, 18(3): 10-15.

[18] 王光荣, 高世霞, 于晓锋, 等. 改性玉米芯对Zn^{2+}和Cu^{2+}的吸附性能研究 [J]. 轻工学报, 2019, 34(2): 56-62.
Wang GR, Gao SX, Yu XF, et al. Research of modified corn cob on the adsorption properties of Zn^{2+}, Cu^{2+} [J]. J Light Ind, 2019, 34(2): 56-62.

[19] 刘宽庆, 张以恒. 木质素的生物降解和生物利用 [J]. 合成生物学, 2024, 5(6): 1264-1278.
Liu KQ, Zhang YH. Biological degradation and utilization of lignin [J]. Synth Biol J, 2024, 5(6): 1264-1278.

[20] 杨航, 宋福超, 王诗涛, 等. 固态发酵平菇-青稞秸秆菌糠饲料化利用研究 [J]. 草地学报, 2025, 33(4): 1289-1298.
Yang H, Song FC, Wang ST, et al. Research on the utilization of solid-state fermented oyster mushroom-highland barley straw fungus-bran as feed [J]. Acta Agrestia Sin, 2025, 33(4): 1289-1298.

[21] 罗俊杰, 肖燕子, 侯美玲, 等. 不同添加剂对苜蓿与羊草混合青贮品质及维生素含量的影响 [J]. 草地学报, 2025, 33(3): 992-1000.
Luo JJ, Xiao YZ, Hou ML, et al. Effects of different additives on quality and vitamin content of mixed silage of alfalfa and *Leymus chinensis* [J]. Acta Agrestia Sin, 2025, 33(3): 992-1000.

[22] 郝迎辰, 黄钰, 张洪瑞, 等. 品种和添加剂对三江源区燕麦青贮品质和CNCPS蛋白组分的影响 [J]. 草地学报, 2025, 33(4): 1274-1280.
Hao YC, Huang Y, Zhang HR, et al. Effects of varieties and additives on silage quality and CNCPS protein fractions of oats in the Sanjiangyuan area [J]. Acta Agrestia Sin, 2025, 33(4): 1274-1280.

[23] 梁文斌, 尹国丽, 陈三冬, 等. 全株玉米青贮过程中品质及真菌群落组成特征 [J]. 草地学报, 2024, 32(12): 3722-3732.
Liang WB, Yin GL, Chen SD, et al. Characteristics of quality and fungal community composition during whole-plant corn silage [J]. Acta Agrestia Sin, 2024, 32(12): 3722-3732.

[24] Sun Y, Liu WC, Shi X, et al. Inducing secondary metabolite production of *Aspergillus sydowii* through microbial co-culture with *Bacillus subtilis* [J]. Microb Cell Fact, 2021, 20: 42.

[25] Datsomor O, Yan Q, Opoku-Mensah L, et al. Effect of different inducer sources on cellulase enzyme production by white-rot basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium* under submerged fermentation [J]. Fermentation, 2022, 8(10): 561.

[26] Yang J, Zhao J, Jiang JC, et al. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. capable of degradating alkali lignin [J]. Front Energy Res, 2021, 9: 807286.

[27] Chen KJ, Tang JC, Xu BH, et al. Degradation enhancement of rice straw by co-culture of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trichoderma viride* [J]. Sci Rep, 2019, 9: 19708.

[28] Niu C, Sun LN, Tang R. Preparation of a bacterial consortium for straw degradation and optimization of conditions for its return to the field [J]. Agronomy, 2025, 15(8): 1947.

[29] Zhang SZ, Duan Y, Teng CC, et al. Fast and selective degradation of biomass for xylose, glucose and lignin under mild conditions [J]. Molecules, 2023, 28(8): 3306.

[30] 蔡吉, 陈文聪, 刘军, 等. 基于两步法制备生物发酵蛋白工艺的研究 [J]. 中国酿造, 2022, 41(10): 207-212.
Cai J, Chen WC, Liu J, et al. Preparation technology of bio-fermented protein based on two-step method [J]. China Brew, 2022, 41(10): 207-212.

[31] 夏欣欣, 林海, 杨谷良, 等. 混菌固态发酵米糠产谷维素的工艺及抗氧化活性评估 [J]. 食品与机械, 2023, 39(9): 154-161.
Xia XX, Lin H, Yang GL, et al. Process study on mixed bacterial solid-state fermentation of rice bran for the preparation of oryzanol and evaluation of its antioxidant activity [J]. Food Mach, 2023, 39(9): 154-161.

[32] Xu XQ, Xu ZQ, Shi S, et al. Lignocellulose degradation patterns, structural changes, and enzyme secretion by *Inonotus obliquus* on straw biomass under submerged fermentation [J]. Bioresour Technol, 2017, 241: 415-423.

[33] Xu QQ, Zhao MJ, Yu ZZ, et al. Enhancing enzymatic hydrolysis of corn cob, corn stover and sorghum stalk by dilute aqueous ammonia combined with ultrasonic pretreatment [J]. Ind Crops Prod, 2017, 109: 220-226.

[34] Tuyen DV, Phuong HN, Cone JW, et al. Effect of fungal treatments of fibrous agricultural by-products on chemical composition and *in vitro* rumen fermentation and methane production [J]. Bioresour Technol, 2013, 129: 256-263.

[35] 杜云龙, 潘金石, 冯鑫, 等. 基于体外产气法的吉林省食用菌菌糠的营养价值评定 [J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51(4): 1520-1529.
Du YL, Pan JS, Feng X, et al. Evaluation of nutritional value of fungus bran in Jilin Province based on *in vitro* gas production method [J]. China Anim Husb Vet Med, 2024, 51(4): 1520-1529.

（责任编辑　朱琳峰）

生物技术通报
· 技术与方法 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):47-54

基于酿酒酵母克隆与错位热循环连接的环状全长人类线粒体DNA制备

彭文慧[1, 2, 3] 李冠初[2, 3] 刘永敏[2, 3] 马文建[1*] 郭晓贤[3*]

（1.天津科技大学生物工程学院,天津 300457; 2.合成生物学海河实验室,天津 300308; 3.中国科学院天津工业生物技术研究所,天津 300308）

摘 要： 【目的】人类线粒体DNA突变与多种疾病相关，但其全长序列在原核宿主中不稳定，体外制备大片段环状DNA也较困难，亟需一套新策略来高效制备环状全长线粒体DNA，以突破线粒体遗传操作的关键技术瓶颈。【方法】首先，为有效克服传统原核克隆系统的宿主毒性问题，利用酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）高效的同源重组系统将全长人线粒体基因组稳定克隆至酵母载体中；同时，通过定点编辑去除了内源的*Eco*R I限制性酶切位点，为克隆的mtDNA提供遗传筛选标记。随后，开发一种基于错位线性化片段的体外热循环连接新策略，以解决线性PCR产物的环化难题。该方法利用耐热连接酶在变性-复性循环中驱动异源双链黏性末端的形成，从而实现长片段DNA的高效环化。【结果】利用该策略成功制备了大小为16.6 kb的全长人线粒体基因组。限制性内切酶图谱分析及外切酶抗性实验证实，合成产物为序列正确、无缺口的共价闭合环状DNA。【结论】建立的“酵母辅助编辑-体外循环组装”技术体系，不仅解决了高质量环状全长mtDNA制备的难题，也为线粒体疾病模型的构建、人工线粒体合成以及线粒体基因治疗载体的开发提供了通用的遗传操作平台。

关键词： 线粒体基因组；同源重组；交叉复性；循环连接；DNA环化；体外合成

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1470

Synthesis of Circular Full-length Human Mitochondrial DNA Based on Yeast Cloning and Staggered Thermal Cycling Ligation

PENG Wen-hui[1, 2, 3] LI Guan-chu[2, 3] LIU Yong-min[2, 3] MA Wen-jian[1*] GUO Xiao-xian[3*]

（1. *College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin* 300457; 2. *Haihe Laboratory of Synthetic Biology, Tianjin* 300308; 3. *Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin* 300308）

Abstract: 【Objective】 Mutations in human mitochondrial DNA (mtDNA) are associated with various diseases. However, the full-length sequence is unstable in prokaryotic hosts, and the *in vitro* preparation of large circular DNA fragments also remains challenging. Therefore, there is an urgent need for a new strategy to efficiently produce circularized full-length mtDNA, in order to overcome the critical technical bottleneck in mitochondrial genetic manipulation. 【Method】 First, to effectively overcome the host toxicity issues inherent in traditional prokaryotic cloning systems, we successfully cloned the full-length human mitochondrial genome into a yeast vector by leveraging the highly efficient homologous recombination system of *Saccharomyces cerevisiae*. Concurrently, site-directed editing was performed to eliminate the endogenous *Eco*R I restriction sites, thereby providing genetic screening markers for the artificially synthesized mtDNA. Subsequently, to address the challenge of circularizing linear PCR products, we developed a novel *in vitro* thermal cycling ligation strategy based on staggered linearized fragments. This method utilizes a thermostable ligase to drive the formation of heteroduplexe cohesive ends during denaturation-renaturation cycles, thereby achieving efficient circularization of long DNA fragments. 【Result】 Experimental results demonstrated the successful synthesis of the 16.6 kb full-length human mitochondrial genome. Restriction mapping and exonuclease resistance assays confirmed

收稿日期：2026-01-02
基金项目：合成生物学海河实验室颠覆性创新类项目（22HHSWSS00027），国家自然科学基金面上项目（32471320）
*通信作者：马文建 ma_wj@tust.edu.cn，郭晓贤 guoxx@tib.cas.cn

that the synthesized product consists of sequence-correct, nick-free, covalently closed circular DNA.【Conclusion】The yeast-assisted editing and *in vitro* cyclic assembly technological system established in this study not only overcomes the difficulty of preparing high-quality circular full-length mtDNA, but also provides a versatile genetic manipulation platform for constructing mitochondrial disease models, synthesizing artificial mitochondria, and developing mitochondrial gene therapy vectors.

Keywords: mitochondrial genome; homologous recombination; cross-annealing; thermal cycling ligation; DNA circularization; *in vitro* synthesis

线粒体在演化过程中，其基因组发生了剧烈的缩减，绝大多数基因转移到了细胞核中，仅保留了极度精简的环状DNA分子，即线粒体DNA（mitochondrial DNA, mtDNA）。人类mtDNA是一个全长约为16.6 kb的双链环状分子[1]。与核基因组不同，mtDNA缺乏内含子且基因间隙极短，这种高度压缩的组织形式意味着其序列中任何位点的突变都可能引发严重的功能缺陷[2]。该基因组编码了线粒体功能不可或缺的37个基因，包括13个氧化磷酸化复合物的核心疏水亚基、22个线粒体特异性tRNA以及2个rRNA（12S和16S）。这些基因产物共同构成了线粒体独立的翻译机器及能量代谢核心。除编码区外，mtDNA仅含有一个主要的非编码控制区（D-loop），它是调控mtDNA复制与转录的枢纽。

与遵循孟德尔遗传的核基因不同，mtDNA表现出独特的遗传特征。一个体细胞内通常含有数千个拷贝的mtDNA，这种多拷贝特性允许野生型与突变型mtDNA在同一细胞中共存，即异质性（heteroplasmy）。线粒体疾病的表型表达遵循阈值效应（threshold effect）：只有当突变型mtDNA的比例累积超过特定临界值（通常>50%–70%）时，才会导致呼吸链功能障碍并诱发临床症状[3]。这种复杂的遗传机制使得线粒体疾病的临床表现呈现出高度的异质性和不可预测性[4]。

基因组工程的常规流程通常依赖于大肠杆菌（*Escherichia coli*）进行克隆、扩增和修饰。然而，对于人类线粒体基因组而言，这一基础步骤却成为了一个长达数十年的技术瓶颈。早在20世纪80年代，研究人员就尝试将完整的人类mtDNA克隆到细菌质粒中，但屡遭失败。含有完整mtDNA序列的质粒转化*E. coli*后，往往导致宿主菌死亡，或迫使质粒发生快速的缺失突变以维持生存[5]。随后的系统性筛选最终确认，编码苏氨酸转运RNA（tRNA-Thr）的区域是导致这种序列特异性毒性的根本原因[6]。鉴于原核宿主的不兼容性，研究人员转向了具有真核同源重组修复机制的酿酒酵母[7]，利用酵母独特的生物学特性，完整的全长人类mtDNA已成功在酵母中实现克隆与稳定维持[8]，这为mtDNA的体外遗传操作提供了潜在的替代平台。

尽管获取mtDNA模板是第一步，但对其进行精准编辑同样面临挑战。由于线粒体缺乏像细胞核那样完善的DNA同源重组修复（HDR）机制，现有的编辑工具在应用上存在显著局限。早期的工具如线粒体靶向锌指核酸酶（MitoZFN）[9]和转录激活样效应因子核酸酶（MitoTALEN）[10]，主要通过切割DNA产生双链断裂（DSB）来诱导突变型mtDNA的降解，仅适用于清除有害突变而非修复。尽管CRISPR/Cas9技术彻底改变了核基因组编辑，但其在线粒体中的应用一直饱受争议。目前尚无公认有效的机制能将外源gRNA高效导入线粒体基质[11]，且Cas9切割产生的DSB同样会导致mtDNA的降解而非修复。近期，研究人员开发的DdCBE（DddA-derived cytosine base editor）[12]和随后的TALED（TALE-linked deaminase）[13]虽然实现了不依赖DSB的碱基编辑，打破了长期僵局，但这些工具仍面临旁观者效应、脱靶风险以及无法纠正插入/缺失突变等固有限制[11]。面对活体编辑的局限性，“体外合成–体内递送”的全基因组替换策略成为新的研究热点。目前已开发出多种突破双层膜阻隔的递送策略，包括MITO-Porter[14]、利用线粒体蛋白输入机制的肽–核酸偶联物[15]，以及MitoPunch压力脉冲技术[16]等。此外，利用靶向线粒体的*Eco*RI限制性内切酶，可有效清除内源性mtDNA，制备出缺乏mtDNA的ρ0细胞[17]，为外源mtDNA的回补创造了理想受体环境。然而，这一策略所需的高质量外源mtDNA的制备，仍存在关键技术缺失。

虽然利用酵母系统可以克隆全长mtDNA，但从酵母中提取的克隆往往混杂大量核基因组DNA，且

难以彻底去除载体骨架。另一方面，通过PCR扩增虽然能获得大量高纯度mtDNA，但产物呈线性构象。天然mtDNA为超螺旋闭合环状结构，直接转染线性DNA极易被胞内酶降解，且无法启动正常的复制与转录。尝试利用常规连接酶对线性产物进行体外环化，通常效率极低，且倾向于形成多聚体或串联产物，难以获得单体环状DNA。

针对上述挑战，本研究提出了体内生物学编辑与体外酶学扩增与环化的整合策略。利用酿酒酵母同源重组系统，规避了大肠杆菌的宿主毒性，实现了全长人类mtDNA的稳定克隆与无痕修饰；针对线性DNA环化效率低的问题，建立基于错位线性化片段的热循环连接方法，可将线性PCR产物高效转化为具有生物活性的共价闭合环状DNA，从而打通从序列编辑到高质量全长线粒体基因组制备的关键路径。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株、细胞系与质粒　人胚胎肾细胞293T（HEK293T）购自中乔新舟，在含有10%胎牛血清（FBS）和1%青霉素-链霉素的双抗DMEM培养基中，于37 ℃、5% CO_2条件下培养。DH5α大肠杆菌用于常规质粒扩增。酿酒酵母（*S. cerevisiae*）菌株BY4741作为宿主进行同源重组克隆。穿梭质粒pRS415及pUC19质粒为本实验室保存。

1.1.2　酶与试剂　*Eco*RI、*Bam*HI、*Cla*I、*Hin*dIII、*Hinc*II、*Sma*I，以及T4 DNA Ligase、Exonuclease V（RecBCD）、T5 Exonuclease均购自NEB。Phusion高保真DNA聚合酶购自赛默飞。耐热连接酶Ampligase购自Lucigen。质粒提取试剂盒及胶回收试剂盒购自天根生化科技。引物由金唯智合成，详细序列见表1。

表1　本研究所使用的引物

Table 1　Primers used in this study

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence（5′-3′）	说明 Notes
A_F1	tgagttacctcactcattagTATGTGTTGTCGTGCAGGTAGAGG	小写字母为pRS415同源序列（Lowercase letters indicate homologous sequences to the pRS415 vector） 加粗字母为*Eco*R I位点内所引入的突变碱基（Bold characters represent the mutated bases introduced within the *Eco*R I recognition site）
D_R4	acaaggaagtacaggacaattgATGACCCACCAATCACATGCCTATCATATAGT	
A_R1	GGCCATTATCGAAGAATT**T**ACAAAAAACAATAGC	
B_F2	GCTATTGTTTTTTGT**A**AATTCTTCGATAATGGCC	
B_R2	CCCTGTTCTTATGAAT**C**CGAACAGCATAC	
C_F3	GTATGCTGTTCG**G**ATTCATAAGAACAGGG	
C_R3	GGTCCATCATAGAATT**T**TCACTGTGATAT	
D_F4	ATATCACAGTGA**A**AATTCTATGATGGACC	
59F	/5Phos/GGCCCTCTCAGCCCTCCTAATGAC	/5Phos/为5′端磷酸化修饰（/5Phos/ indicates a 5′ phosphorylation modification）
59R	/5Phos/CCTGTTAGGGGTCATGGGCTGGGTTTTACTATATGATAGGCATGTGATT GGTGGGTCATTATGTGTTGTCGTGCAGGTAGAGGC	
F40	/5Phos/AAAACCCAGCCCATGACCCCTAACAGGGGCCCTCTCAGCCCTCCTAATG ACCTCCGGCCTAGCCATGTGAT	
R41	/5Phos/ACTATATGATAGGCATGTGATTGGTGGGTCATTATGTGTTGTCGTGCAG GTAGAGGCTTACTAGAAGTGTG	

1.2　方法

1.2.1　全长线粒体基因组的酵母同源重组克隆　提取HEK293T细胞总DNA作为模板。根据GenBank中的人线粒体基因组序列（NC_012920.1）及pRS415载体序列，设计4对含有重叠区域的引物（A_F1/R1，B_F2/R2，C_F3/R3，D_F4/R4）。在引物设计中引入同义突变以破坏*ND1*、*ND2*和*ND5*基因中的*Eco*R I位点（详见表1）。使用高保真聚合酶扩增出4个重叠片段，回收纯化后与扩增的pRS415载体按摩尔比2∶1混合。利用乙酸锂转化法将混合物共转化至酿

酒酵母感受态细胞中，涂布于SC-Leu缺陷培养基，于30 ℃培养3–4 d。挑选单克隆进行菌落PCR验证，阳性克隆提取质粒后通过测序确认突变位点及连接处的序列正确性。

1.2.2 错位线性化片段的制备 pUC19模型：提取pUC19质粒，分别使用*Hinc* II和*Sma* I进行单酶切消化，产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离并回收，获得两组末端位置相差17 bp的平末端线性片段。线粒体基因组：以构建正确的酵母重组质粒为模板，使用5′端磷酸化的引物对（59F/R和F40/R41）进行高保真PCR扩增。扩增产物经凝胶回收纯化，测定浓度备用。

1.2.3 体外变性–复性热循环连接 配制20 μL反应体系：包含等摩尔量的两组错位线性DNA片段（各约100 ng）、1 × Ampligase Reaction Buffer，以及5 U Ampligase。反应在热循环仪中进行，程序如下：预变性：95 ℃处理2 min。循环连接：95 ℃变性30 s，随后降低至退火/连接温度（60 ℃或70 ℃）保持15 min。共进行4个循环。对照组反应体系中不加入Ampligase，其余条件相同。

1.2.4 外切酶处理与环化验证 循环反应产物分别进行以下处理以验证拓扑结构：Exonuclease V处理：向反应产物中加入Exonuclease V及ATP，于37 ℃孵育30 min，以消化残留的线性DNA。T5 Exonuclease处理：产物与T5 Exonuclease混合，于37 ℃孵育30 min，以消化线性和开环DNA，富集共价闭合环状DNA。酶切图谱分析：纯化后的mtDNA环化产物使用*Hind* III进行酶切，pUC19环化产物使用*Bam*HI进行酶切，产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测。

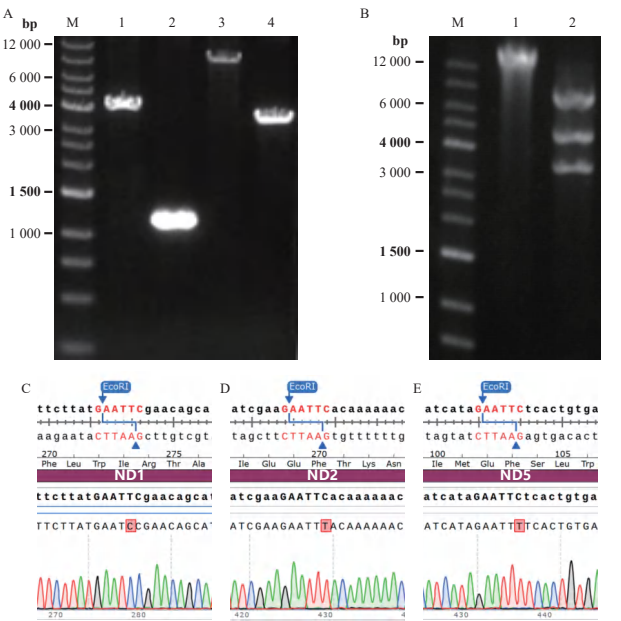
1.2.5 测序分析 T5 Exonuclease处理后的抗性产物经纯化后，使用对应连接位点附近的引物进行Sanger测序，验证连接处的序列完整性。

2 结果

2.1 完整线粒体基因组的重组克隆

序列分析表明，293T细胞线粒体基因组含有3个*Eco*R I限制性内切酶识别位点，分别位于*ND1*、*ND2*及*ND5*基因编码区内。为了将完整的293T细胞mtDNA克隆至酿酒酵母，本研究采用了酵母体内同源重组策略，并通过引入同义突变消除内源性的*Eco*R I位点，从而提供一个有效的遗传标记，用以区分和筛选人工合成的mtDNA。首先，分别在3个*Eco*R I位点及ATP6与COX3交界处设计扩增引物，并在引物中引入突变。接下来以293T细胞总DNA为模板进行PCR扩增，获得4个长度分别为4、12、8、3.5 kb的片段（图1-A）。这些片段覆盖全长mtDNA且末端具有相互重叠DNA序列；随后，将这些片段与携带末端同源片段的低拷贝穿梭载体pRS415共转化酿酒酵母。经SC-Leu缺陷培养基筛选后，通过菌落PCR验证了各重组连接位点的正确性。

随后，利用引物对F40/R41从验证正确的克隆



A：用于酵母同源重组的4个重叠PCR片段电泳图。M：DNA marker。B：组装后全长mtDNA的验证。泳道1：引物F40/R41扩增的全长PCR产物。泳道2：*Cla* I和*Bam*H I双酶切验证，显示预期大小的条带（~8 kb，5 kb，3.5 kb）。C–E：测序峰图确认消除了*Eco*R I位点的同义突变（红框所示）。分别为ND1（m.4125T>C）（C），ND2（m.5280C>T）（D）和ND5（m.12645C>T）（E）。上图：野生型序列；下图：突变序列

A: Gel electrophoresis of the four overlapping PCR fragments used for yeast homologous recombination. M: DNA marker. B: Validation of the assembled mtDNA. Lane 1: Full-length PCR product amplified by primers F40/R41. Lane 2: Restriction digest with *Cla*I and *Bam*HI showing expected fragments (~8 kb, 5 kb, and 3.5 kb). C–E: Sequencing chromatograms confirming synonymous mutations (red boxes) that eliminate *Eco*RI sites. C: ND1 (m.4125T>C); D:ND2 (m.5280C>T); E: ND5 (m.12645C>T). Top: Wild-type sequence; bottom: mutated sequence

图1 无*Eco*R I位点的全长人线粒体基因组重组克隆的构建与验证

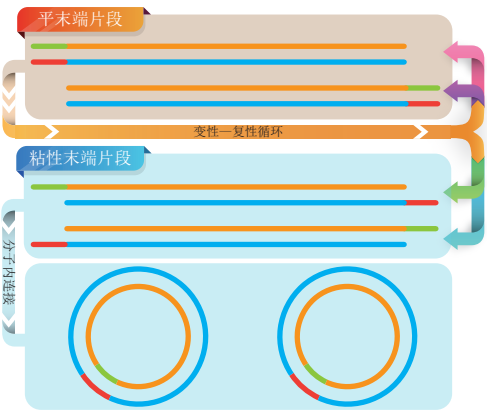
Fig. 1 Construction and verification of recombinant clone of *Eco*R I-free full-length human mitochondrial genome

中扩增出预期的全长mtDNA（图1-B，泳道1）。对该PCR产物进行*Cla* I和*Bam*H I双酶切鉴定，电泳结果显示获得了约8、5和3.5 kb的3条特异性片段，与理论预测一致（图1B，泳道2）。进一步的Sanger测序分析证实，在靶向的m.4125T、m.5280C及m.12645C位点均成功引入了同义突变：*ND1*基因第273位异亮氨酸（Ile）密码子由ATT变为ATC，*ND2*基因第270位及*ND5*基因第103位苯丙氨酸（Phe）密码子均由TTC变为TTT（图1-C–E）。综上所述，利用酿酒酵母高效的同源重组机制，成功构建了去除*Eco*R I位点的全长线粒体基因组穿梭质粒。

2.2　线性DNA体外环化新方法的建立与验证

由于PCR扩增获得的mtDNA为线性平末端DNA，为实现其高效环化，设计了一种基于错位线性化DNA片段（staggered linearized DNA）的循环连接环化方法（图2）。作为概念验证，首先利用pUC19质粒评估了该方法的有效性。分别使用*Hinc*II和*Sma*I对环状质粒pUC19进行单酶切，将其线化，获得两组平末端线性DNA片段。由于这两种酶的识别位点在质粒序列上相隔17个碱基对，因此所产生的两组片段的末端位置相互错开。将这两组片段等量混合，在含有耐热连接酶（Ampligase）的体系中进行连续的变性–退火–连接循环。在退火过程中，来源于不同酶切产物的单链DNA发生交叉配对，形成具有互补黏性末端的异源双链DNA（图2，中间浅蓝色框所示），进而被Ampligase特异性识别并连接环化。尽管同源配对会重新形成无法被连接的平末端双链（图2，棕色框所示），但它们可在随后的循环中解离并再次参与异源配对，从而驱动反应累积环化产物。循环反应结束后，利用Exonuclease V消化去除残留的线性DNA，即可获得环化的DNA。

琼脂糖凝胶电泳结果显示（图3），天然pUC19质粒呈现典型的超螺旋环状构象，且不被Exonuclease V消化（泳道1），而单纯混合的错位线性片段呈现单一线性条带（泳道2），且对Exonuclease V敏感（泳道3）。经过变性–复性循环（无连接酶对照）处理后，出现了一条迁移率较线性片段更慢的新条带（泳道4），推测为退火形成的带有缺口（nick）的开环DNA（open circular DNA）。而在添加Ampligase的实验组中，出现了一条迁移率较快、位置接近天然



错位平末端片段进行变性–复性循环。互补链间的交叉杂交产生具黏性末端的异源双链（中图），作为分子内连接形成环状DNA（下图）的底物。平末端同源双链（上图）重新进入热循环，从而驱动平衡向环状产物积累方向移动

Blunt-ended fragments with staggered termini undergo denaturation-renaturation cycles. Cross-hybridization between complementary strands generates cohesive-ended heteroduplexes (middle panel) that serve as substrates for intramolecular ligation into circular DNA (bottom panel). Blunt-ended homoduplexes (top panel) are recycled through further thermal cycles, shifting the equilibrium toward circular product accumulation

图2　错位线性化DNA片段的变复性循环连接环化策略示意图

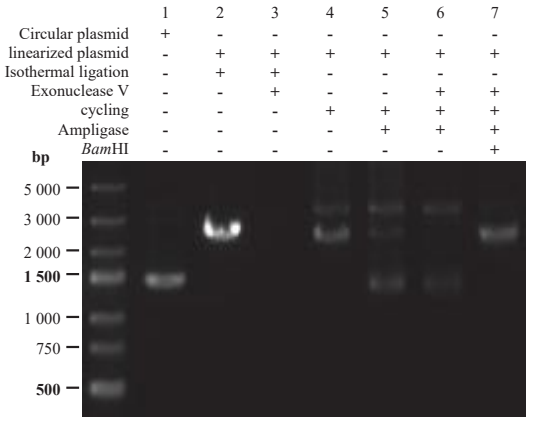
Fig. 2　Schematic illustration of the staggered linear DNA circularization strategy

超螺旋质粒的条带。Exonuclease V处理结果表明，线性DNA条带完全消失，而主要产物条带保留（泳道6），证实其具有核酸外切酶抗性，为环状结构。随后使用*Bam*H I对该抗性产物进行单酶切，重新释放出与线性对照长度一致的单一条带（泳道7）。上述结果证实，该反应体系成功生成了共价闭合环状DNA，验证了本文开发的错位线性化循环连接环化方法的有效性。

2.3　线粒体DNA的体外环化与制备

尽管酵母克隆系统能获得完整的线粒体基因组，但受限于低拷贝载体的特性，其mtDNA提取效率较低且难以彻底去除载体骨架。相比之下，PCR技术虽能大量制备高纯度mtDNA，但其线性构象限制了下游应用。为获得高产量的全长环状mtDNA，将上述开发的体外环化策略应用于全长mtDNA扩增产物。

本研究设计了两组5′端磷酸化的引物对（59F/R和F40/R41），通过PCR扩增获得末端相互错开的全长mtDNA线性片段。随后，将这两组片段混合，分



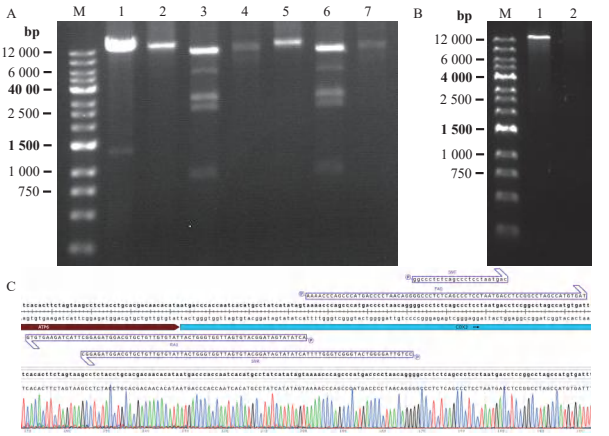
反应产物的琼脂糖凝胶电泳分析。泳道 1–3（对照组）：天然环状 pUC19 表现出对 Exonuclease V 的抗性（泳道 1），而错位线性底物混合物则被完全降解（泳道 3），验证了外切酶的选择性。泳道 4：在无 Ampligase 参与的热循环中，底物发生复性形成开环 DNA，但未形成共价闭合环状 DNA。泳道 5–6：完整的连接反应体系生成了多种构象产物（泳道 5），经 Exonuclease V 处理后仍保留特异性条带（泳道 6），证实成功连接成了闭合环状 DNA。泳道 7：对外切酶抗性产物进行 *Bam*HI 单酶切，获得与初始线性底物大小一致的单一线性条带（对比泳道 2），确认组装产物为正确的单体质粒

Agarose gel electrophoresis analysis of the reaction products. Lanes 1–3 (Controls): Native circular pUC19 exhibits resistance to Exonuclease V digestion (Lane 1), whereas the staggered linear substrate is completely degraded (Lane 3), confirming the selectivity of the exonuclease. Lane 4: Thermal cycling without Ampligase yields re-annealed complexes (likely nicked or concatenated). Lanes 5–6: The full ligation reaction generates products (Lane 5) that remain detectable after Exonuclease V treatment (Lane 6), confirming the formation of covalently closed circular DNA. Lane 7: Linearization of the Exonuclease V-resistant product with *Bam*HI restores a single band identical in size to the input linear substrate (Lane 2), verifying the correct assembly of the monomeric plasmid

图 3 pUC19 错位线性化后使用变性–复性–连接循环重新环化检测与验证

Fig. 3 Detection and validation of pUC19 recircularization via misprimed linearization followed by denaturation-renaturation-ligation cycling

别在 60 ℃和 70 ℃的退火/连接温度下进行热循环反应。琼脂糖凝胶电泳结果如图 4-A 所示。为验证产物的环化状态，利用 *Hin*d III 对产物进行了酶切分析。293T 细胞 mtDNA 序列中含有 3 个 *Hin*d III 位点，若为线性 PCR 产物，完全酶切将产生 10 202、3 003、2 474 和 890 bp 四个片段；而一旦成功环化，线性分子的首尾片段将重新连接，从而在酶切后产生一条特征性的 5 477 bp 片段（由 3 003 bp 与 2 474 bp 片段融合而成）。电泳结果显示，所有环化组（泳道 3 和 6）均清晰地出现了该 5 477 bp 特征条带，有力证明了错位线性 mtDNA 已成功发生分子内连接。此外，环化产物经 Exonuclease V 处理后仍能检测到 DNA 条带，基于 Exonuclease V 降解线性 DNA 的特性，进一步证实了环状结构的形成。



A：环化产物的琼脂糖凝胶电泳分析。泳道 1：错位线性 mtDNA 片段混合物。泳道 2 和 5：分别在 60 ℃和 70 ℃条件下进行热循环连接的产物。泳道 3 和 6：对应产物的 *Hin*d III 酶切图谱。约 5.5 kb 特征条带（由 3 003 bp 和 2 474 bp 的末端片段融合形成）的出现证实了线性的首尾连接与环化。泳道 4 和 7：经 Exonuclease V 处理后的产物，显示出外切酶抗性条带，表明环状结构的存在。M：DNA Marker。B：利用 T5 Exonuclease 验证共价闭合环状 DNA。泳道 1：环化产物保留了抗性条带，表明形成了无缺口的 cccDNA。泳道 2：线性 mtDNA 对照被完全降解。M：DNA Marker。C：连接位点的序列验证。上图：位于 *ATP6* 和 *COX3* 基因交界处的引物对（59F/R 和 F40/R41）结合位点示意图。下图：T5 Exonuclease 抗性产物的 Sanger 测序峰图，证实了连接位点处序列的准确还原

A: Electrophoretic analysis of the circularization products. Lane 1: Mixture of overlapping linear mtDNA fragments. Lanes 2 and 5: Products obtained after thermal cycling ligation at 60 ℃ and 70 ℃, respectively. Lanes 3 and 6: *Hind* III restriction digests of the circularization products. The appearance of a characteristic ~5.5 kb band (fusion of the 3 003 bp and 2 474 bp terminal fragments) confirms successful circularization, distinct from the linear restriction pattern. Lanes 4 and 7: Products treated with Exonuclease V, showing resistant high-molecular-weight bands indicative of circular structure. M: DNA Marker. B: Validation of covalently closed circular (ccc) DNA using T5 Exonuclease. Lane 1: The cyclized product retains a resistant band, confirming the formation of nick-free cccDNA. Lane 2: Linear mtDNA control is completely degraded. M: DNA Marker. C: Sequence verification of the ligation junction. Top: Schematic illustrating the binding sites of the primer pairs (59F/R and F40/R41) at the boundary of the *ATP6* and *COX3* genes. Bottom: Sanger sequencing chromatogram of the T5 Exonuclease-resistant product, confirming the precise sequence restoration across the ligation site without mutations or deletions

图 4 全长人线粒体基因组的体外环化与验证

Fig. 4 *In vitro* circularization and validation of the full-length human mitochondrial genome

鉴于T5 Exonuclease能特异性降解线性及带有缺口的开环DNA，进一步使用T5 Exonuclease处理产物以富集共价闭合环状DNA。如图4-B所示，对照组线性mtDNA被完全消化，而环化产物中保留了显著的抗性条带，表明成功制备了无缺口的闭合环状mtDNA。由于PCR扩增的断点位于*ATP6*与*COX3*基因交界处，对T5 Exonuclease抗性产物进行了测序分析。结果证实，包括连接位点在内的序列完全正确（图4-C）。综上所述，利用该体外循环环化新方法，本研究成功将线性扩增的全长mtDNA转化为序列精确的闭合环状DNA。

3　讨论

本研究建立了一套整合酿酒酵母同源重组与变复性循环连接的全新技术体系，有效解决了线粒体基因组难以在原核系统中克隆以及体外难以制备全长闭合环状DNA的两大难题。长期以来，大肠杆菌对某些真核线粒体序列的不稳定性或毒性耐受低，限制了mtDNA的完整克隆。本研究利用酿酒酵母高效的同源重组能力，不仅实现了全长mtDNA的稳定克隆，更提供了一个灵活的遗传操作平台。通过该平台，研究人员可以根据需求对mtDNA进行改造，例如编辑酶切位点作为筛选标记，或定点引入致病性突变。这种“先在酵母中编辑，再体外扩增环化”的策略，为反向遗传学研究提供了高质量的模板来源。

在克隆保真性方面，酿酒酵母高效的同源重组机制为大片段mtDNA的准确组装提供了生物学基础。除PCR扩增阶段的保真度外，mtDNA中$tRNA^{Thr}$基因在宿主中的表达毒性往往是导致片段重排或点突变的主要诱因。此前已有研究尝试利用高拷贝的2 μ质粒克隆全长人类mtDNA，但在筛选大量克隆后未获成功，说明高剂量暴露下的序列毒性会产生剧烈的宿主选择压力。采用低拷贝载体实现全长序列的准确克隆，表明降低拷贝数可有效将毒性抑制在细胞耐受阈值内。尽管本研究尚未对该系统的长期遗传稳定性进行评估，但理论上可进一步尝试将mtDNA定点整合至酵母基因组，利用单拷贝维持策略进一步削弱潜在毒性并提升序列稳定性。

针对PCR产物无法直接模拟天然mtDNA超螺旋结构的局限，本研究开发的基于错位线性化片段的体外变性–复性循环连接方法拥有独特的技术优势。与传统的T4连接酶体系相比，该方法利用耐热连接酶（Ampligase）在高温循环中通过DNA变复性，促使无法连接环化的平末端同源双链解离，并重新配对形成具有互补黏性末端的可连接环化异源双链，从而驱动产物向环状DNA累积。这一策略能够有效处理长度和序列构成多样的DNA分子。此外，该方法为制备具有复杂结构的DNA分子提供了新思路，例如通过设计特定的错配引物，该体系可用于制备带有定点错配或包含特定化学修饰的杂合双链环状DNA，这对于研究DNA修复机制或核酸–蛋白相互作用具有重要价值。

尽管错位片段环化方法有效，但在实际应用中仍需考虑其动力学特征与局限性。环化效率可能受多种因素共同制约，包括片段长度、序列组成、错位黏性末端的长度以及DNA浓度。理想情况下的单轮环化效率为50 %。本研究在使用错位pUC19片段进行环化的实际操作中，实现了平均31%的单轮环化效率。由于环化效率主要取决于DNA复性的动力学与分子内连接效率，其中DNA复性效率将随循环反应中线性片段的减少而降低，较难调控，而分子内连接的动力学则主要受黏性末端控制且在循环反应中相对稳定。因此，改变错位距离以调控黏性末端长度，应作为优化特定序列片段环化效率的优选参数。

此外，必须正视的是，长时间的高温变性–复性循环可能会对DNA链造成潜在的热损伤，如碱基脱氨或脱嘌呤，这可能会影响后续的转染效率或生物学功能。同时，与细胞内天然提取的mtDNA相比，体外合成的产物缺乏天然的表观遗传修饰。另一个不可忽视的问题是副产物的形成：尽管电泳检测主要显示单体环状条带，但理论上反应过程中不可避免会通过分子间连接形成二聚体或多聚体。对于纯度要求高的下游应用，建议在环化后引入额外的凝胶回收或层析纯化步骤。

4　结论

本研究通过整合酿酒酵母同源重组与错位热循环连接技术，成功建立了全长人类线粒体基因组体外制备的新策略。该策略在利用酿酒酵母宿主规避了mtDNA在原核系统中的序列毒性与不稳定性，实

现了全长序列的克隆与精准编辑的基础上，通过创新性的变复性循环连接解决了长片段PCR产物的环化难题，获得了序列准确的共价闭合环状DNA。这一技术路径为线粒体反向遗传学研究、疾病模型构建及基因治疗载体的开发提供了简便、通用的遗传操作手段。

参考文献

[1] Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations [J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(12): 878-890.

[2] Park J, Baruch-Torres N, Yin YW. Structural and molecular basis for mitochondrial DNA replication and transcription in health and antiviral drug toxicity [J]. Molecules, 2023, 28(4): 1796.

[3] Belousova V, Ignatko I, Bogomazova I, et al. Causes of and solutions to mitochondrial disorders: a literature review [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(14): 6645.

[4] Mei JL, Ding P, Gao C, et al. Mitochondrial diseases: molecular pathogenesis and therapeutic advances [J]. MedComm, 2025, 6(9): e70385.

[5] Tapper DP, Van Etten RA, Clayton DA. Isolation of mammalian mitochondrial DNA and RNA and cloning of the mitochondrial genome [M]//Biomembranes Part K: Membrane Biogenesis: Assembly and Targeting (Prokaryotes, Mitochondria, and Chloroplasts). Amsterdam: Elsevier1983: 426-434.

[6] Mita S, Monnat RJ, Loeb LA. Direct selection of mutations in the human mitochondrial $tRNA^{Thr}$ gene: reversion of an 'uncloneable' phenotype [J]. Mutat Res Mutagen Relat Subj, 1988, 199(1): 183-190.

[7] Ruiz E, Talenton V, Dubrana MP, et al. CReasPy-cloning: a method for simultaneous cloning and engineering of megabase-sized genomes in yeast using the CRISPR-Cas9 system [J]. ACS Synth Biol, 2019, 8(11): 2547-2557.

[8] Bigger BW, Liao AY, Sergijenko A, et al. Trial and error: how the unclonable human mitochondrial genome was cloned in yeast [J]. Pharm Res, 2011, 28(11): 2863-2870.

[9] Gammage PA, Rorbach J, Vincent AI, et al. Mitochondrially targeted ZFNs for selective degradation of pathogenic mitochondrial genomes bearing large-scale deletions or point mutations [J]. EMBO Mol Med, 2014, 6(4): 458-466.

[10] Reddy P, Ocampo A, Suzuki K, et al. Selective elimination of mitochondrial mutations in the germline by genome editing [J]. Cell, 2015, 161(3): 459-469.

[11] Lim K. Mitochondrial genome editing: strategies, challenges, and applications [J]. BMB Rep, 2024, 57(1): 19-29.

[12] Guo JY, Chen XX, Liu ZW, et al. DdCBE mediates efficient and inheritable modifications in mouse mitochondrial genome [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2022, 27: 73-80.

[13] Cho SI, Lim K, Hong S, et al. Engineering TALE-linked deaminases to facilitate precision adenine base editing in mitochondrial DNA [J]. Cell, 2024, 187(1): 95-109, e26.

[14] Yamada Y, Fukuda Y, Harashima H. An analysis of membrane fusion between mitochondrial double membranes and MITO-Porter, mitochondrial fusogenic vesicles [J]. Mitochondrion, 2015, 24: 50-55.

[15] Rai PK, Craven L, Hoogewijs K, et al. Advances in methods for reducing mitochondrial DNA disease by replacing or manipulating the mitochondrial genome [J]. Essays Biochem, 2018, 62(3): 455-465.

[16] Sercel AJ, Patananan AN, Man TX, et al. Stable transplantation of human mitochondrial DNA by high-throughput, pressurized isolated mitochondrial delivery [J]. eLife, 2021, 10: e63102.

[17] Kukat A, Kukat C, Brocher J, et al. Generation of rho0 cells utilizing a mitochondrially targeted restriction endonuclease and comparative analyses [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(7): e44.

（责任编辑　朱琳峰）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):55-66

基于WGCNA的玉米雄穗耐热相关共表达模块鉴定和核心基因发掘

秦天元 吕玉平 阿不来提·阿布拉 韩登旭 董远 张雪 杨杰*
（新疆维吾尔自治区农业科学院作物研究所，乌鲁木齐 830091）

摘 要： 【目的】挖掘玉米中与热胁迫调控通路、抗逆指标紧密相关的核心基因，为解析玉米耐热机理提供新方向。【方法】选用耐热性较强的自交系PHBA6和热敏感自交系吉63为材料，分别在田间和温室条件下种植，于开花前期实施热胁迫处理。基于转录组测序分析，系统比较热胁迫条件下2种基因型雄穗的分子响应特征。【结果】在PHBA6中共鉴定1 288个差异表达基因，在吉63中共鉴定到912个差异表达基因。进一步通过加权基因共表达网络分析（weighted gene co-expression network analysis, WGCNA）构建与抗逆表型性状相关的基因共表达网络，共鉴定出15个与雄穗耐热性显著相关的基因模块。其中，4个与目标性状相关性最高的模块中进一步筛选出一批潜在关键基因，这些基因主要涉及转录调控、蛋白稳态维持、活性氧代谢及胁迫信号转导等生物学过程。【结论】系统揭示了玉米雄穗在热胁迫下的关键调控网络特征，明确了一批与耐热性密切相关的核心基因及其潜在调控通路。

关键词： 玉米；热胁迫；加权基因共表达网络；转录组学
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1424

Identification of Heat-responsive Co-expression Modules and Mining of Hub Genes in Maize Tassel Based on WGCNA

QIN Tian-yuan LYU Yu-ping ABULAITI Abula HAN Deng-Xu DONG Yuan ZHANG Xue YANG Jie*
(*Institute of Crop Research, Academy of Agricultural Sciences of Xinjiang Uyghur Autonomous Region, Urumqi* 830091)

Abstract: 【Objective】To identify hub genes closely associated with heat stress regulatory pathways and stress-resistance traits, and to provide new insights into the molecular mechanisms underlying heat tolerance in maize (*Zea mays*). 【Method】A heat-tolerant inbred line, PHBA6, and a heat-sensitive inbred line, Ji63, were used as experimental materials. Plants were grown under both field and greenhouse conditions, and heat stress was imposed at the early flowering stage. Based on transcriptome sequencing, the molecular response characteristics of tassels from the two genotypes under heat stress were systematically compared. 【Result】A total of 1 288 differentially expressed genes (DEGs) were identified in PHBA6, whereas 912 DEGs were detected in Ji63 under heat stress. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was further performed to construct gene co-expression networks associated with stress-resistance phenotypic traits, resulting in the identification of 15 gene modules significantly correlated with tassel heat tolerance. Among them, four modules showing the strongest correlations with target traits were selected, and a set of potential key genes was screened. These genes were mainly involved in biological processes such as transcriptional regulation, protein homeostasis maintenance, reactive oxygen species metabolism, and stress signal transduction. 【Conclusion】This study systematically reveals the key regulatory network characteristics of maize tassels under heat stress and identifies a group of hub genes closely associated with heat tolerance and their potential regulatory pathways.

Keywords: maize; heat stress; weighted gene co-expression network; transcriptome

收稿日期：2025-12-26
基金项目：新疆维吾尔自治区“天池英才”项目，新疆维吾尔自治区农业科学院稳定支持（xjnkywdzc-2024003-13，xjnkywdzczc-2025001-43），新疆维吾尔自治区重大科技专项（2024A02003-2），新疆维吾尔自治区重点研发计划（2024B02008-1），新疆维吾尔自治区“天山英才”项目
*通信作者：杨杰 155165876@qq.com

玉米（*Zea mays*）是我国种植面积最大的粮食作物之一，不仅是保障国家粮食安全的重要作物，同时也是重要的动物饲料来源、工业加工原料及生物质能源载体，在农业生产、畜牧养殖和能源开发等领域均具有不可替代的战略地位[1-2]。保证玉米正常生产，对于保障我国粮食安全、推动农业产业升级及支撑经济社会可持续发展具有重要的战略意义与实践价值[3]。

新疆地处我国西北边陲、欧亚大陆腹地，属典型的干旱半干旱大陆性气候区，光热资源丰富，且昼夜温差显著，为作物生长提供了独特的气候条件[4]。小麦、玉米与水稻作为新疆地区三大大宗粮食作物，其适种范围广泛，覆盖全疆绝大多数区域，三者播种面积合计占粮食作物总播种面积的90%以上[5]。受全球气候变化的影响，高温和热胁迫已成为限制玉米等作物生产的最严重自然灾害之一，对粮食安全构成重大威胁[6]。近年来，新疆地区降水稀少且蒸发量大，日最高气温≥35 ℃的酷热日数呈逐年递增趋势，对玉米生长发育构成显著威胁[7]。在田间，玉米花药经常不能露出颖壳，不能开裂散粉而形成“实药”，雄穗干枯产生“干梢”或“白灼”，严重时甚至完全干枯，玉米雄穗“干梢”现象频发，最终导致田间花粉量减少或不育，花粉活力降低，在此类高温干旱复合胁迫下，玉米在抽雄吐丝等关键生育期极易发生花粉活力下降、授粉受阻及结实率降低，严重时可导致大幅减产甚至绝收[7]。因此，深入剖析玉米耐热相关性状的遗传基础，挖掘耐热基因，培育耐热稳产玉米新品种，对于促进农业可持续发展，提升农户经济收益水平，筑牢国家粮食安全防线均具有重要的理论价值与实践意义[8]。

在响应热胁迫的过程中，玉米植株的正常生长及细胞内代谢过程受到干扰，引起产量和品质下降，严重的甚至导致死亡[9-11]。近年来，利用遗传学、分子生物学和多组学等手段，在玉米中相继克隆了一些与热胁迫响应相关的基因，如热激转录因子ZmHSF08通过结合并抑制*ZmUGT92A1*基因的表达，负调控玉米的耐热性。过表达*ZmHSF08*导致玉米耐热性降低，而过表达*ZmUGT92A1*则提高了玉米的耐热性[12]。ZmHSF20通过抑制*ZmHSF4*和纤维素合成酶基因*ZmCesA2*的表达，降低纤维素合成，削弱细胞壁稳定性，从而降低耐热性。在*Zmhsf20*突变体中，*ZmHSF4*和*ZmCesA2*表达上调，增强纤维素合成，提高细胞壁稳定性，增强耐热性[13]。bZIP60能激活关键热激转录因子基因*HSFTF13*的表达，进而上调热激蛋白HSP的转录水平，正向调控植物热激反应；相反，在高温胁迫条件下，*bzip60*突变体中*HSP*基因的正常上调表达受到显著抑制，导致植物对高温的热激反应明显钝化[14-15]。玉米热休克因子A2（ZmHSFA2）与热休克结合蛋白2（ZmHSBP2）可发生相互作用，二者拮抗调控半乳糖醇合成酶2（*ZmGOLS2*）基因的表达和棉子糖生物合成[16]。因此，解析玉米响应热胁迫的遗传与分子机制，改善植株生理生化指标，有利于保证玉米在热胁迫条件下的正常生产。

尽管目前玉米中已克隆鉴定出多个与耐热相关的基因，但多数研究仍停留在单基因功能验证或表型层面，对其调控网络、作用机制及生殖阶段特异性功能缺乏系统解析。特别是在雄穗发育等关键产量形成时期的耐热分子机制研究仍较为薄弱。同时，部分已报道基因在不同遗传背景中的稳定性和育种利用价值尚未充分验证，限制了其在生产实践中的推广应用。因此，有必要深入挖掘关键调控因子，解析其分子机制与调控网络，为玉米耐热分子设计育种提供理论依据和基因资源。

本研究以耐热差异明显的玉米自交系PHBA6和吉63为试验材料，进行田间和温室大棚的热胁迫处理，取其雄穗进行转录组测序，结合表型指标和产量数据，借助加权基因共表达网络分析（weighted gene co-expression network analysis, WGCNA）构建基因共表达网络，并将获得的基因模块与表型数据及产量数据开展关联分析，挖掘与热胁迫调控通路、抗逆指标紧密相关的核心基因，为玉米耐热机理的深入解析提供新方向。

1 材料与方法

1.1 材料

选择2个生育期相同、耐热差异明显的玉米自交系PHBA6（PHZ51×PHG47）和吉63［（127-32×铁84）（W24×W20）辐）］为材料（表1），PHBA6和吉63的种子由新疆维吾尔自治区农业科学院作物

表1　试验材料

Table 1　Experimental materials

自交系 Inbred line	母本 Maternal parent	父本 Paternal parent
PHBA6	PHZ51	PHG47
吉63	(127-32×铁84)	(W24×W20)辐

研究所玉米遗传育种与栽培创新团队提供。

1.2　*方法*

1.2.1　试验设计　试验地位于新疆维吾尔自治区农业科学院安宁渠综合试验场（43°58′53.38"N，87°30′17"E）。采用完全随机区组设计，因子为品系（PHBA6、吉63）与生长环境/处理（田间常温对照、温室高温胁迫），共2×2处理组合。高温处理通过温室控温方式施加，田间自然生长条件作为常温对照，除温度处理外，各处理在播种时间、出苗、间苗、施肥、灌溉及病虫害防治等农艺管理措施上保持一致，尽量降低非温度环境因素对试验结果的影响。每个处理设置3个生物学重复，每个重复由10株单株独立栽培。小区栽培密度为行距55 cm×株距20 cm，每小区至少栽培30株，以满足取样及后续表型测定需求。各处理内植株在小区随机分布，并进行随机取样。

在开花前期（雄穗可见膨大且尚未抽雄）施加热胁迫，以模拟热时段对雄穗发育的影响，温室设置为高温胁迫组，白天维持36-38 ℃（10-12 h），夜间维持26-28 ℃，胁迫持续10 d。田间自然生长温度为对照。热胁迫处理第5天时，于上午9：00-11：00统一采集雄穗组织，每个生物学重复从3-5株中各取1个完整雄穗，每个处理3个生物学重复，液氮速冻，-80 ℃保存备用。一部分用于转录组测序；一部分用于实时荧光定量PCR分析。穗长、穗粗和产量等农艺性状数据来源于同一处理和同一重复内未取样的其余植株，这些植株在相同处理条件下继续生长至成熟期，用于后期表型测定和关联分析。

1.2.2　转录组数据的获取与分析　在不同胁迫条件下，共采集12个样品［2个材料（PHBA6、吉63）×2个处理×3个重复］进行转录组测序。转录组数据分析采用玉米参考基因组B73（AGPv5）及其对应的基因注释文件作为参考序列，均从Ensembl Plants数据库下载（http://plants.ensembl.org/Zea_mays/Info/Index）。首先，使用Hisat2（版本2.2.10）将热处理与对照文库的测序数据分别与玉米参考基因组进行比对；随后，采用Samtools（版本0.1.19）将SAM格式文件转换为BAM格式文件，并对BAM文件进行重新排序；基于排序后的BAM文件，采用Cufflinks（版本1.2）进行转录本组装、丰度估计，同时完成样本间差异表达分析及可变剪切检测；最后，采用Python中用于高通量数据处理的HTSeq包计算各样本的基因表达量。根据基因长度和匹配到该基因的片段数目（read count值），计算每一个基因的FPKM（ragments per kilobase of exon per million fragments mapped），即每1百万个map上的reads中map到外显子的每1千个碱基上的reads的个数。一般情况下，当基因的FPKM绝对值大于1时认为其表达，否则认为其不表达。将表达的基因用DESeq2 R package（v3.5.2）软件和WGCNA进行多样本间差异表达分析，基于抗逆相关表型数据的模块划分及核心基因筛选。为了精确定位核心基因，利用$P<0.01$的差异表达基因进行后续筛选。采用AgriGo（http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/）[17-18]在线软件进行GO富集分析，其中，显著富集的GO类别P值应小于0.05。进一步基于R语言clusterProfiler软件包对差异表达基因进行KEGG通路富集分析，采用超几何检验评估通路显著性，$P<0.05$作为显著富集阈值。最后，利用利用Cytoscape[19]软件对基因调控网络进行可视化构建与分析。

1.2.3　候选基因的RT-qPCR验证　采用Trizol法提取玉米组织总RNA，经1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性，并利用NanoDrop 2000测定RNA浓度及纯度（$OD_{260/280}$=1.8-2.2）。RT-qPCR反应体系为2×SYBR Green Mix 10 μL、上下游引物各0.4 μL（10 μmol/L）、cDNA模板2 μL，用ddH_2O补足至20 μL。扩增程序为95 ℃ 3 min；95 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s，共35个循环；每个样品设置3个生物学重复和3个技术重复。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算相对表达量，并对RT-qPCR与RNA-seq表达趋势进行比较分析。

1.2.4　候选基因亚细胞定位　构建候选基因与绿色荧光蛋白（green fluorescent protein, GFP）的融合表达载体。根据候选基因CDS序列设计特异性引物，扩增目标片段并克隆至植物表达载体pBI121-GFP

中，使其与GFP融合表达。重组质粒经测序验证正确后，转化至农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）GV3101感受态细胞。采用农杆菌介导瞬时表达法，将重组菌液注射4-6周龄烟草（*Nicotiana benthamiana*）叶片。培养48-72 h，取叶片表皮细胞，在激光共聚焦显微镜下观察GFP荧光信号。以空载体GFP作对照，根据荧光信号分布判断目标蛋白的亚细胞定位特征。

2 结果

2.1 差异基因的分析

通过二代转录组测序，12个样本共获得72.64 Gb原始测序片段，经过滤，得到240 563 102个Q30>95.64%的clean reads，其GC含量范围均为51.02%-55.99%。12个样本中，clean reads与基因组的匹配率皆大于96.21%，说明所有试验样品的采集及测序结果高度可信。基于每个转录本的read count值，利用DESeq2软件进行目的样本间的差异表达基因分析，以校正后的P<0.01为阈值，以差异倍数|log$_2$FC|>1为条件，筛选出差异极显著的转录本，用于后续分析。

通过对PHBA6和吉63在高温胁迫下的转录组数据与各自对照组进行比较，结果显示，在高温胁迫下，耐热型自交系PHBA6特异性表达的差异基因数量为1 288个，显著高于热敏感型自交系吉63的912个。表明PHBA6对高温胁迫具有更广泛的转录响应，可能具备更为复杂和丰富的热应激调控机制。进一步分析发现，2个自交系在高温胁迫下共同表达的差异基因有823个，构成高温胁迫下的核心共享基因，这些基因可能参与热休克蛋白、抗氧化酶等保守的热应激通路（图1）。综上所述，PHBA6在高温胁迫下展现出更为活跃的基因表达调控能力，同时与吉63共享一套核心的热应激响应机制，表明2个自交系在应对高温胁迫时，既存在共同的保守防御通路，也表现出品种特异性的调控网络差异，从分子水平解释了PHBA6相较于吉63具有更强高温耐受能力的潜在原因。

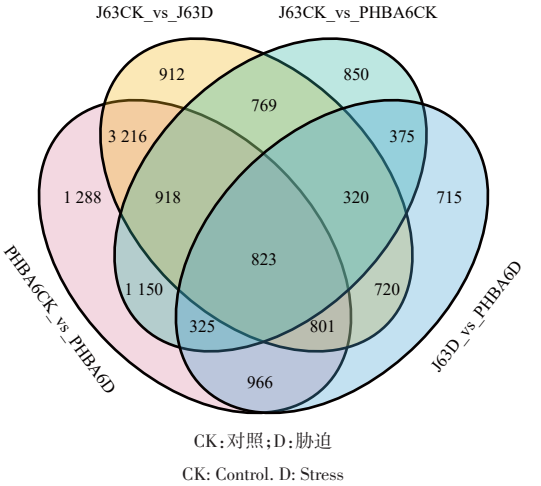


图1 不同处理下PHBA6与吉63雄穗中差异表达基因数

Fig. 1 Differentially expressed genes in tassels of PHBA6 and J63 under different treatment

2.2 双亲在热胁迫下差异基因的WGCNA分析

2.2.1 WGCNA分析中软阈值的确定 通过计算任意2个基因表达谱之间的皮尔逊相关系数，构建基因相似性矩阵，其计算公式为Smn=cor(xm, xn)，其中，Smn表示基因m和基因n之间的相关系数，S=[Smn]为基因相似性矩阵。为使所构建的网络符合无尺度网络（scale-free topology）特征，利用WGCNA包中的pickSoftThreshold函数对软阈值β进行评估与筛选（图2）。结果表明，在PHBA6和吉63 2个自交系中，当β=12时，网络较好地满足无尺度拓扑分布特征。因此，后续共表达网络分析采用β=12作为软阈值参数。

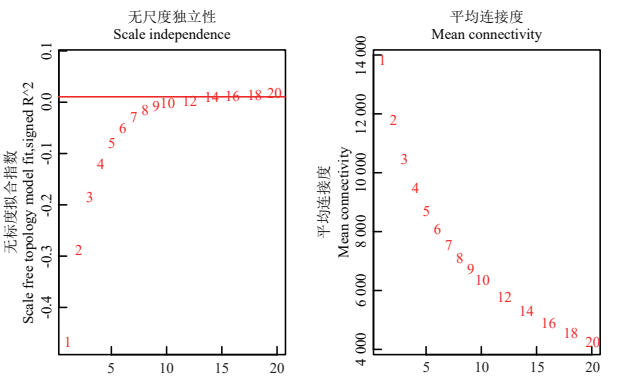
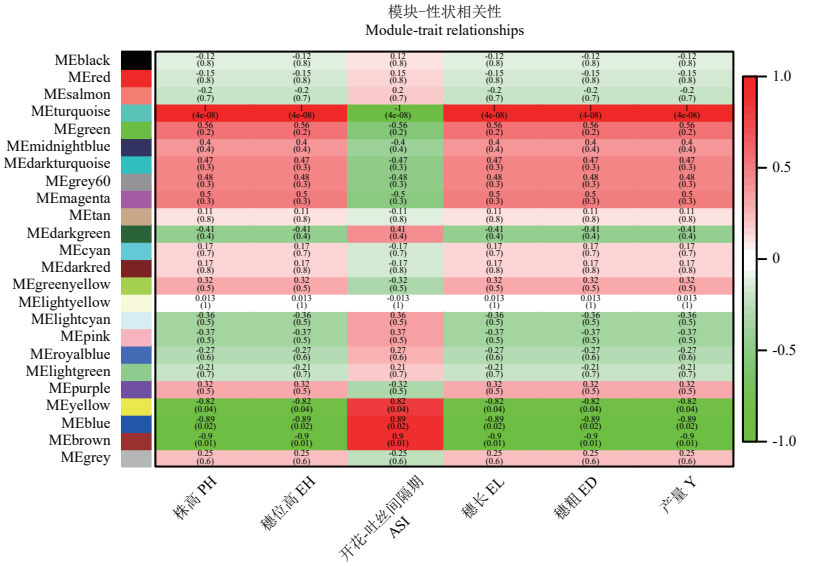


图2 基因共表达网络分析中软阈值的确定

Fig. 2 Determination of soft thresholds for gene co-expression networks

2.2.2 WGCNA分析中基因模块与表型性状之间的关联热图 将差异基因，结合样本株高（plant height, PH）、穗位高（ear height, EH）、开花吐丝间隔期

(anthesis-silking interval, ASI)、穗长（ear length, EL)、穗粗（ear diamete, ED）和产量（yield, Y）等性状矩阵，共得到24个与这些性状相关联的模块热图（图3)。其中，每个性状都有与其显著相关联的模块，turquoise模块与PH、EH、EL、ED和Y存在极显著正相关（均为r=1，P=4E-08)，与ASI存在极显著负相关（r=-1，P=4E-08)；brown模块与H、EH、EL、ED和Y存在极显著负相关（均为r=-0.9，P=0.01)，与ASI存在极显著正相关（r=0.9，P=0.01)。



横轴表示不同的性状，纵轴表示每一个模块的特征向量。红色的格子代表性状与模块具有正相关性，绿色的格子代表性状与模块具有负相关性。PH：株高；EH：穗位高；ASI：开花吐丝间隔期；EL：穗长；ED：穗粗；Y：产量

The horizontal axis indicates different traits, and the vertical axis indicates the eigenvector of each module. Red grids indicate a positive correlation between traits and modules, while green grids indicate a negative correlation between traits and modules. PH: Plant height. EH: Ear height. ASI: Anthesis-silking interval. EL: Ear length ED: Ear diameter. Y: Yield

图3　基因共表达网络模块与性状的关联热图

Fig. 3　Correlation heatmap of gene co-expression network modules and traits

为深入解析与目标性状高度关联的特异性模块的生物学功能，提取模块内具有代表性的特征向量基因（module eigengene, ME)，用ME代表模块中成千上万的基因进行相关性分析，利用这种方法可以进一步理清基因模块与模块之间的相互关系及与不同性状之间的相关性，从而筛选出目标基因模块。ME之间的相关性越高，其所在模块的相关性也就越高，通过两两之间的ME相关性分析发现，brown模块与turquoise模块中ME之间的相关性达到0.90，blue模块与green模块中ME之间的相关性达到0.88（图4)，tuqurise和green模块内基因与大部分表型指标呈正相关，blue和brown模块内基因与大部分表型指标呈负相关；因此，将这4个模块作为目标基因模块进行后续研究。

2.3　基因共表达网络中候选模块中基因的GO富集分析

为进一步挖掘候选模块中基因的功能，利用R包clusterProfile分别对筛选出的4个候选模块（brown、green、blue和turquoise）进行GO功能富集分析（图5)。结果表明，4个模块都可以显著富集到生物学过程（biological process, BP)、细胞组分（cellular component, CC）和分子功能（molecular function, MF)。其中，brown模块中主要显著富集在细胞壁组织、碳水化合物生物合成过程、细胞稳态、蛋白质在膜上的定位、细胞碳水化合物生物合成过程、蛋白质泛素化、蛋白质-DNA复合体、线粒体质子转运ATP合酶复合物、UDP-糖基转移酶活性、泛素-

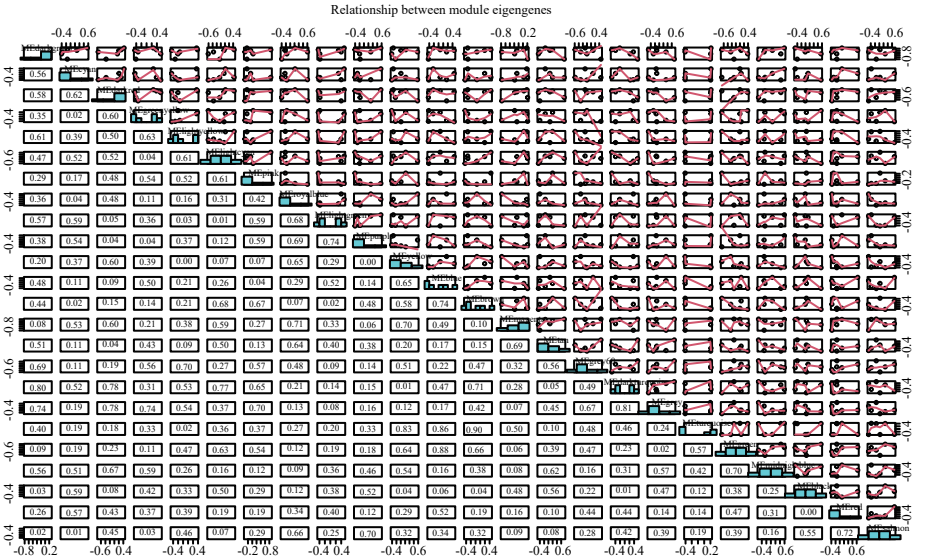
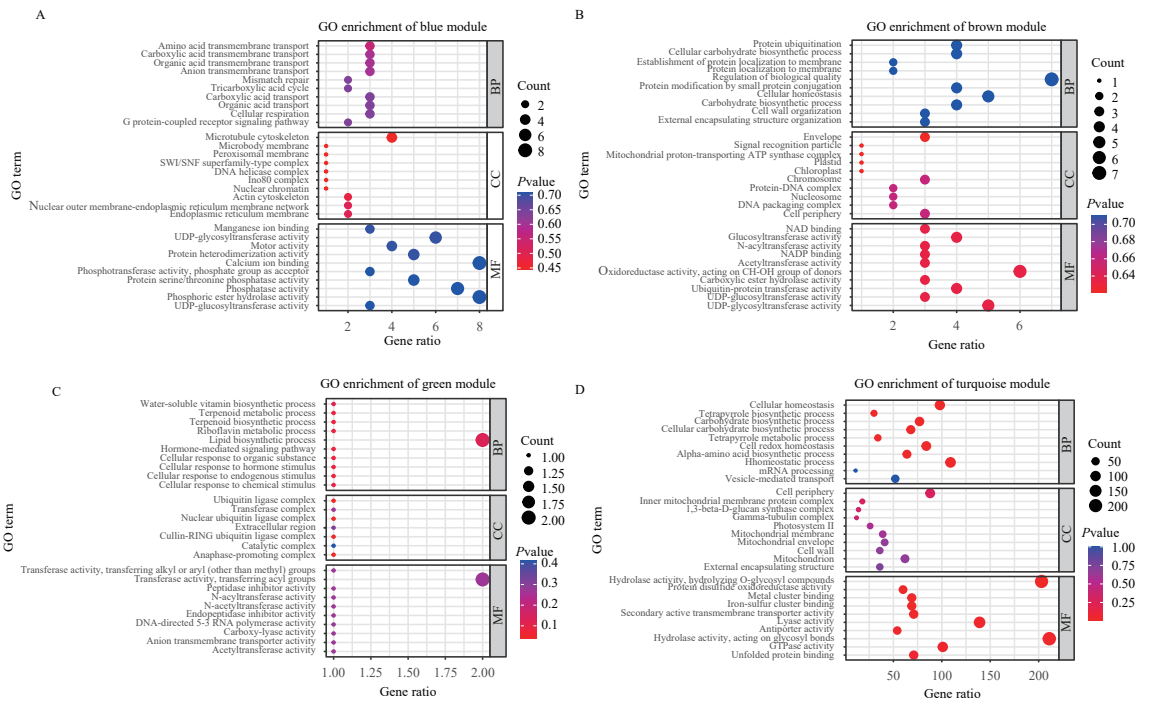


图4 基因共表达网络不同模块间ME的相关性

Fig. 4 Correlation of module eigengenes (ME) among different modules in the gene co-expression network



A、B、C和D分别表示blue、brown、green和turquoise模块内基因的GO富集分析结果。颜色深浅表示显著性水平，红色越深表示*P*值越小(显著性越高)，蓝色表示*P*值较大(显著性较低)，下同。圆点大小表示富集基因的数量，圆越大，富集基因数目越多

A, B, C, and D refers to the GO enrichment analysis results of genes in the blue, brown, green, and turquoise modules, respectively. The color intensity indicates the significance level: the darker the red, the smaller the *P*-value (higher significance), while blue indicates a larger *P*-value (lower significance), the same below. The sizes of the dots indicate the number of enriched genes; the larger the dot, the greater the number of enriched genes

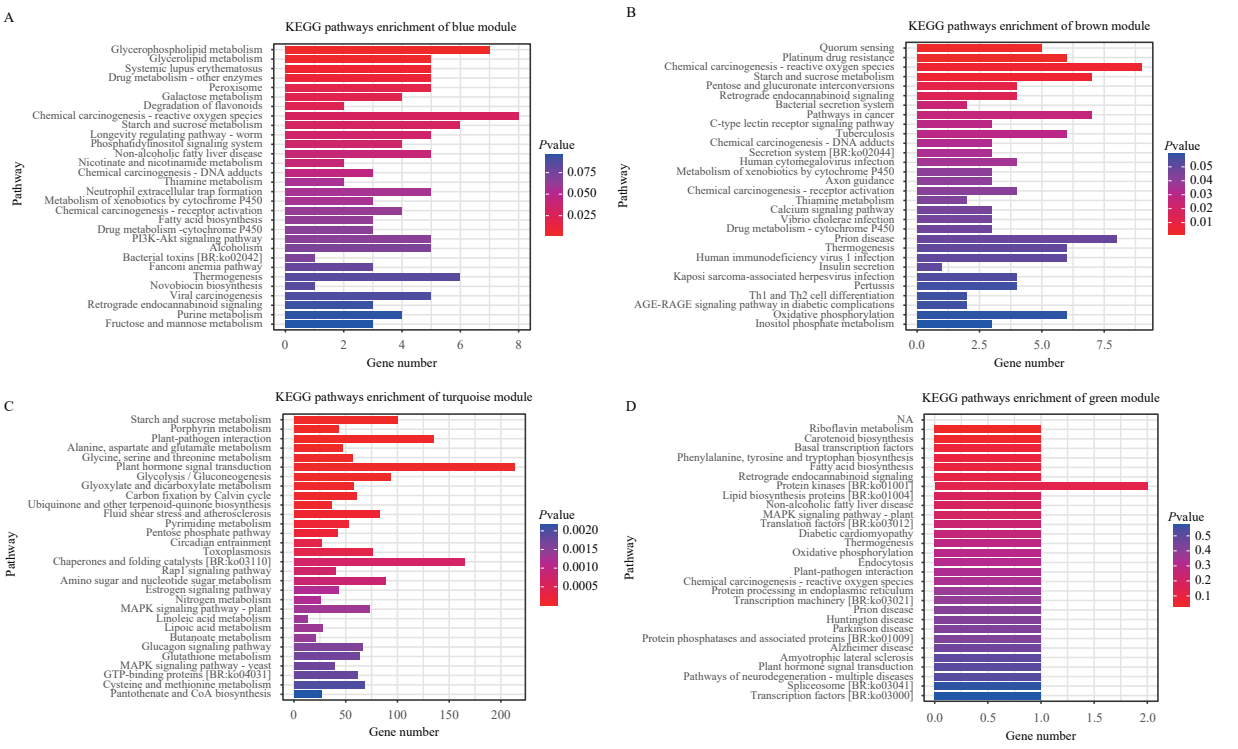
图5 候选模块中基因的GO富集

Fig. 5 GO enrichment of genes in candidate modules

蛋白转移酶活性、氧化还原酶活性、乙酰转移酶活性和N-酰基转移酶活性等GO term；green模块中主要显著富集在细胞对内源性刺激的反应、细胞对激素刺激的反应、细胞对有机物的反应、激素介导的信号通路、脂质生物合成过程、萜类生物合成过程、核泛素连接酶复合物、转移酶复合体、泛素连接酶复合物、阴离子跨膜转运蛋白活性、羧基裂合酶活性、DNA导向的5-3-RNA聚合酶活性、内肽酶抑制剂活性、N-乙酰转移酶活性和N-酰基转移酶活性等GO term；blue模块中主要显著富集在氨基酸跨膜转运、三羧酸循环、有机酸运输、细胞呼吸、肌动蛋白细胞骨架、核外膜–内质网膜网络、磷酸转移酶活性、钙离子结合、蛋白质异二聚化活性和UDP-糖基转移酶活性等GO term；turquoise模块中主要显著富集在碳水化合物生物合成过程、四吡咯代谢过程、细胞氧化还原稳态、α-氨基酸生物合成过程、mRNA加工、水解酶活性、GTP酶活动、水解酶活性、逆向转运蛋白活性、裂合酶活性、次级活性跨膜转运蛋白活性、光系统II、γ-微管蛋白复合体、1,3-β-D-葡聚糖合酶复合物和线粒体内膜蛋白复合物等GO term。

2.4　基因共表达网络中候选模块中基因的KEGG富集分析

为进一步探究候选模块中基因的功能，继续利用R包clusterProfile分别对筛选出的4个候选模块（brown、green、turquoise和blue）进行KEGG功能富集分析。结果显示（图6），在brown模块中主要显著富集在淀粉和蔗糖代谢、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化、内源性大麻素逆向信号传导、细胞色素P450对外源性物质的代谢、钙信号通路、硫胺素代谢、肌醇磷酸盐代谢和氧化磷酸化等通路；green模块中主要显著富集在脂质生物合成蛋白、蛋白激酶、内源性大麻素逆向信号传导、脂肪酸生物合成、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、基础转录因子、类胡萝卜素生物合成、核黄素代谢、MAPK信号通



A、B、C和D分别表示blue、brown、turquoise和green模块内基因的KEGG富集分析结果

A, B, C, and D refers to the KEGG enrichment analysis results of genes in the blue, brown, turquoise, and green modules, respectively

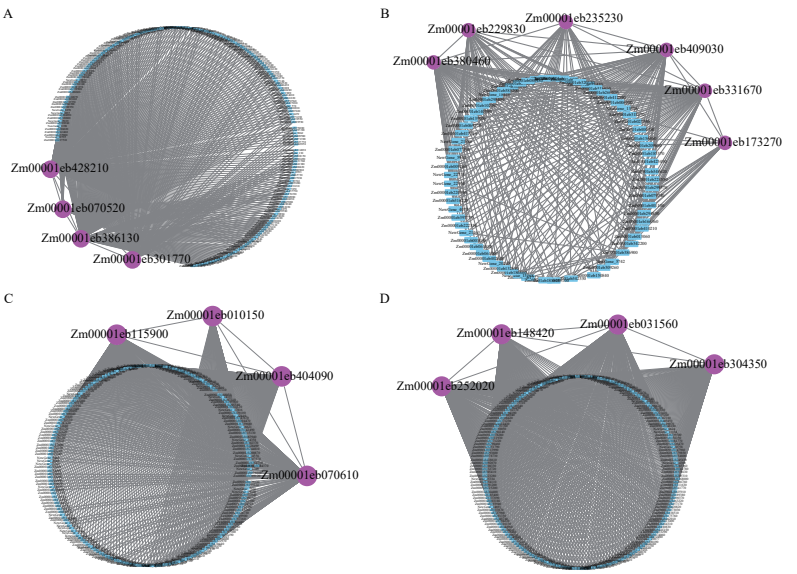
图6　候选模块中基因的KEGG富集

Fig. 6　KEGG enrichment of genes in candidate modules

路–植物、植物–病原体相互作用、内吞作用、氧化磷酸化、内质网中的蛋白质加工、蛋白磷酸酶和相关蛋白、植物激素信号转导和转录因子等通路；blue模块中主要显著富集在甘油磷脂代谢、黄酮类化合物的降解、半乳糖代谢、过氧化物酶体、烟酸和烟酰胺代谢、磷脂酰肌醇信号系统、淀粉和蔗糖代谢、细胞色素P450对外源性物质的代谢、脂肪酸生物合成、果糖和甘露糖代谢和嘌呤代谢等通路；turquoise模块中主要显著富集在卡尔文循环固碳乙醛酸盐和二羧酸盐代谢、糖酵解/葡萄糖生成、植物激素信号转导、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、植物–病原体相互作用、卟啉代谢、淀粉和蔗糖代谢、戊糖磷酸途径、丁酸代谢、硫辛酸代谢、亚油酸、MAPK信号通路–植物、氮代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、泛酸和辅酶A生物合成、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、GTP结合蛋白和谷胱甘肽代谢等通路。

2.5 基因共表达网络中候选模块中核心基因的可视化

为了探索上述4个候选模块中核心基因的功能，利用Cytoscape软件对模块内基因网络进行可视化处理，筛选出模块中高连通性的基因，首先计算各基因的模块成员关系（kME）和基因显著性（GS），将kME≥0.8且GS显著（P<0.05）的基因定义为模块核心基因（hub genes）。此外，基于拓扑重叠矩阵（topological overlap measure, TOM）评估基因间连通性，并将模块内连通度排名前5%的基因视为高度连通基因以进一步支持核心基因的筛选（图7），在该网络中，每一个节点代表一个基因，节点通过线相联系，处于连线两端的基因通常被认为具有相同的生物功能。在brown模块中挑选出4个核心基因，green模块中挑选出6个核心基因，turquoise模块中挑选出4个核心基因，blue模块中挑选出4个核心基因；为了探究这些核心基因的功能，利用玉米数据库（https://maizegdb.org/）和NCBI数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）来查询这些核心基因的功能，并借助TAIR数据库（https://www.arabidopsis.org/）注释了拟南芥同源基因的功能（表2），通过已报道的文献，发现这些筛选出的核心基因大多数都与植株发育以及逆境胁迫相关，其中，在拟南芥中，Zm00001eb070520的同源基因*AT4G28815*属于碱性螺旋–环–螺旋（bHLH）转录因子超家族，酵母双杂交和体外结合试验证明，*AT4G28815*可以形成同源二聚体和异源二聚体，参与植物对温度的响应；



A、B、C和D分别为brown、green、turquoise和blue模块；“粉红色圆”代表核心基因

A, B, C, and D indicate the brown, green, turquoise, and blue modules respectively; the “pink circles” indicate the core genes

图7 候选模块中基因共表达网络及核心基因的挖掘

Fig. 7 Mining of gene co-expression networks and hub genes in candidate modules

表2　不同模块中核心基因的功能注释

Table 2　Functional annotation of hub genes in different modules

模块 Module	核心基因 Hub gene	拟南芥同源基因 Homologous gene in *A. thaliana*	基因功能 Gene function
blue	Zm00001eb428210	*AT5G47060*	假设蛋白(DUF581) Hypothetical protein (DUF581)
blue	Zm00001eb070520	*AT4G28815*	碱性螺旋–环–螺旋(bHLH)DNA结合超家族蛋白 Basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
blue	Zm00001eb386130	*AT5G64790*	O-糖基水解酶家族17蛋白 O-Glycosyl hydrolases family 17 protein
blue	Zm00001eb301770	X	未知功能 Unknown
brown	Zm00001eb115900	X	未知功能 Unknown
brown	Zm00001eb010150	*AT1G14710*	富含羟脯氨酸的糖蛋白家族蛋白 Hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
brown	Zm00001eb404090	X	转导蛋白家族蛋白/WD-40重复序列家族蛋白 Transducin family protein/WD-40 repeat family protein
brown	Zm00001eb070610	X	未知功能 Unknown
green	Zm00001eb380460	*AT3G02380*	CONSTANS类似蛋白2 CONSTANS-like 2
green	Zm00001eb229830	*AT3G61350*	SKP1相互作用伙伴4 SKP1 interacting partner 4
green	Zm00001eb235230	*AT4G03030*	半乳糖氧化酶/kelch重复超家族蛋白 Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
green	Zm00001eb409030	X	未知功能 Unknown
green	Zm00001eb331670	X	未知功能 Unknown
green	Zm00001eb173270	*AT1G32730*	(1 of 1) PTHR35696:SF1-F6N18.11
turquoise	Zm00001eb252020	*AT1G75330*	鸟氨酸氨甲酰转移酶 Ornithine carbamoyltransferase
turquoise	Zm00001eb148420	*AT1G56410*	热休克70 kD蛋白 Heat shock 70 kD protein-like
turquoise	Zm00001eb031560	*AT2G43010*	编码一个与活性PhyB蛋白相互作用的核定位bHLH蛋白 Encodes a nuclear localized bHLH protein that interacts with active PhyB protein
turquoise	Zm00001eb304350	X	未知功能 Unknown

注：X表示无拟南芥同源基因

Note: X indicates that no homologous gene was identified in *A. thaliana*

Zm00001eb386130在拟南芥中的同源基因*AT5G64790*参与细胞壁合成和重塑或细胞间信号传导，并且能够响应逆境胁迫及促进花粉萌发和花粉管生长；Zm00001eb010150在拟南芥中的同源基因*AT1G14710*是一种与光合作用相关的RNA结合蛋白，能够对周围环境和生理做出反应；Zm00001eb148420在拟南芥中的同源基因*AT1G56410*在开花和轻度热应激反应中发挥重要功能，*AT1G56410*是花朵开放和轻度热响应的必需基因。*AT1G56410*突变导致22 ℃时植株结实率显著降低，27 ℃时更为严重。*AT1G56410*的突变还导致2个侧萼片重叠顶端的后生融合，导致开花失败、花器官形成异常以及受精和结实受损；

Zm00001eb031560在拟南芥中的同源基因*AT2G43010*（*AtPIF4*）通过编码与活性PhyB蛋白相互作用的核定位蛋白bHLH来平衡植物的生长和高温防御等。

2.6 基因共表达网络候选模块中核心基因的RT-qPCR验证

从挑选的4个候选基因模块中筛选到18个可能与雄穗响应热胁迫相关的核心基因（表2），进一步根据基因功能，分析18个基因在不同样本中的表达变化，结果显示（图8），荧光定量PCR结果与转录组结果一致，进一步证明转录组测序数据结果的可靠性，并从中筛选表达量高且与热胁迫相关的基因Zm00001eb031560（*ZmPIF4*）进行后续的功能验证。

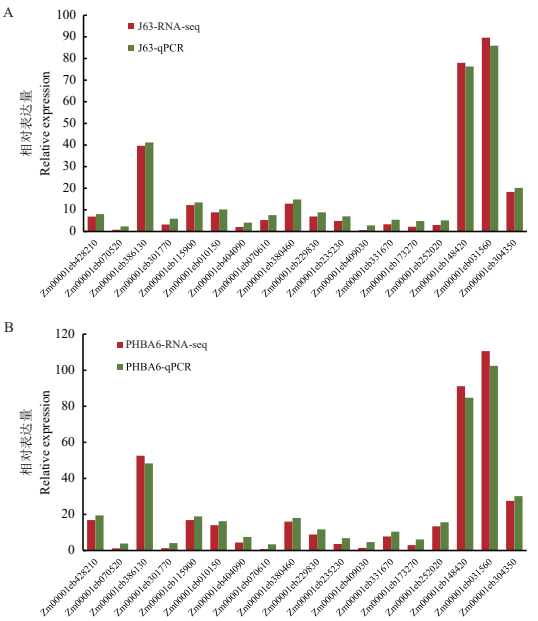


图8 核心基因的RT-qPCR与RNA-seq交互验证

Fig. 8 Cross-validation of hub genes by RT-qPCR and RNA-seq

2.7 ZmPIF4的亚细胞定位

亚细胞定位结果显示，阳性对照35S:GFP在烟草叶肉细胞的细胞核和细胞膜中均可检测到绿色荧光信号，表明游离GFP能够在细胞内自由扩散。而在35S:ZmPIF4:GFP转化的烟草叶片细胞核中观察到明显的绿色荧光信号（图9）。表明ZmPIF4主要定位于细胞核并可能在细胞核相关信号传导过程中发挥重要作用。

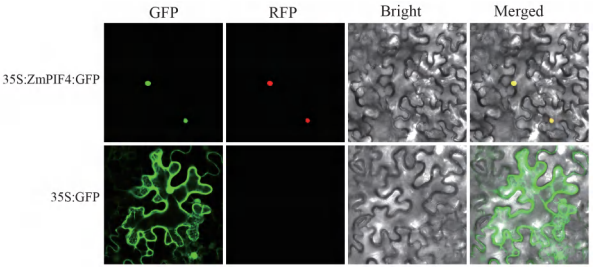


图9 玉米ZmPIF4蛋白的亚细胞定位

Fig. 9 Subcellular localization of the ZmPIF4 protein in *Z. mays*

3 讨论

玉米作为全球第一大作物，在粮食安全、饲料供应和工业加工等领域具有不可替代的重要地位[20]。然而，玉米虽为喜温作物，却对高温胁迫高度敏感，其生长发育易受到抑制。在全球气候变暖背景下，高温事件频发已成为威胁玉米生产稳定性的主要因素之一[21]。持续或极端高温可扰乱玉米正常生理代谢，延缓生长发育，导致花粉育性下降及籽粒灌浆受阻，最终造成显著减产[22-23]。因此，解析玉米耐热性的遗传基础、挖掘关键基因并培育耐热高产新品种，对保障新疆乃至全国玉米产业可持续发展具有重要意义。

雄穗发育期是玉米对高温最敏感的阶段之一，开花前遭遇高温会显著降低花粉活力并抑制散粉过程，进而影响授粉结实[24]，因此选用耐热性差异显著的材料是解析其分子机制的关键。本研究以耐热自交系PHBA6和热敏感自交系吉63为材料，在雄穗膨大但未抽雄阶段在温室进行高温胁迫，模拟自然条件下的热胁迫环境，为筛选耐热相关基因提供了可靠体系。基于转录组数据的加权基因共表达网络分析（WGCNA），本研究构建了玉米雄穗响应热胁迫的基因调控网络，并筛选出与耐热性显著相关的关键模块，这些模块通常参与特定生物学过程[25-26]。本研究共鉴定出多个相关模块，并筛选出与目标性状关系密切的核心模块，功能富集分析表明，这些模块主要涉及能量代谢、碳代谢、信号转导及激素调控等过程，其中，研究表明热激转录因子（HSFs）家族在植物热胁迫反应中扮演关键角色，在玉米应答高温胁迫过程中，通过调控下游基

因表达提高植物的耐热性[13]。此外，淀粉和蔗糖代谢、细胞色素P450介导的代谢过程、钙信号通路及氧化磷酸化等均被证实参与植物耐热调控[27-31]。本研究结果表明，上述通路在关键模块中均有不同程度富集，进一步验证了其在玉米耐热过程中的重要作用。同时，植物激素信号通路，尤其是脱落酸（ABA），在逆境响应中具有重要调节功能，可通过调控基因表达及生理过程增强植物抗逆性[32]。部分模块显著富集于激素信号转导通路，表明激素调控在玉米耐热过程中同样发挥重要作用，进一步分析表明，相关模块还涉及糖代谢及能量代谢途径，如糖酵解及碳同化等过程，这些途径有助于维持细胞能量供应，从而提高植株在高温胁迫下的适应能力。总体来看，玉米耐热性是多通路协同调控的复杂性状，涉及代谢调节、信号转导及转录调控等多个层面，本研究筛选的核心基因多与植物发育及逆境响应相关，可能在热胁迫应答过程中发挥重要作用。

尽管本研究取得了一定进展，但仍存在局限性。首先，仅选取2个玉米自交系，遗传背景较为单一，可能限制耐热相关基因的全面挖掘，未来可扩大材料范围，纳入不同遗传背景及耐热类型的种质资源，以提高研究结果的代表性；其次，本研究仅关注开花前期雄穗对热胁迫的响应，而玉米不同生育阶段对高温的响应机制可能存在差异，后续研究可从全生育期角度开展系统分析。此外，本研究主要基于转录组数据，缺乏蛋白质组和代谢组层面的验证，未来可结合多组学技术，系统解析蛋白表达调控及代谢变化，从而更全面揭示玉米耐热的分子机制。总体而言，本研究基于WGCNA方法初步解析了玉米雄穗响应高温胁迫的共表达网络及潜在调控途径，为耐热关键基因的挖掘提供了重要线索，随着多组学数据整合及功能验证的深入研究，有望进一步阐明玉米耐热的分子机制，为耐热玉米种质创新及新品种培育提供理论依据和技术支撑。

4　结论

基于12个转录组数据成功构建了基因共表达网络，鉴定出15个玉米雄穗耐热性密切相关的基因模块，挑选出4个与目标性状关联度最佳的基因模块，在brown、green、turquoise及blue模块中分别挑选出4、6、4、4个核心基因，这些基因可能通过热激转录因子介导的植物激素信号传导等途径，参与玉米热胁迫相关的调控通路。

参考文献

[1] Qu JZ, Xu ST, Gou XN, et al. Time-resolved multiomics analysis of the genetic regulation of maize kernel moisture [J]. Crop J, 2023, 11(1): 247-257.

[2] Yan YY, Duan FY, Li X, et al. Photosynthetic capacity and assimilate transport of the lower canopy influence maize yield under high planting density [J]. Plant Physiol, 2024, 195(4): 2652-2667.

[3] Ning Q, Jian YN, Du YF, et al. An ethylene biosynthesis enzyme controls quantitative variation in maize ear length and kernel yield [J]. Nat Commun, 2021, 12: 5832.

[4] 常晓春, 李建平, 郝晓燕, 等. 新疆玉米苗期耐旱性状全基因组关联分析 [J]. 现代农业科技, 2022(21): 24-27.
Chang XC, Li JP, Hao XY, et al. Genome-wide association analysis of drought tolerance traits at maize seedling stage in Xinjiang [J]. Mod Agric Sci Technol, 2022(21): 24-27.

[5] 窦婉毓, 颜双双, 孙仁华, 等. 基于21世纪以来我国作物产量、人口与政策分析未来秸秆还田的必然性 [J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(12): 291-305.
Dou WY, Yan SS, Sun RH, et al. Inevitability of straw-returning to the field in the future: an analysis based on crop yield, population, and policy in China since the 21st century [J]. J China Agric Univ, 2025, 30(12): 291-305.

[6] Dong ZB, Xu ZN, Xu L, et al. *Necrotic upper tips1* mimics heat and drought stress and encodes a protoxylem-specific transcription factor in maize [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(34): 20908-20919.

[7] Wang YY, Sheng DC, Zhang P, et al. High temperature sensitivity of kernel formation in different short periods around silking in maize [J]. Environ Exp Bot, 2021, 183: 104343.

[8] Zhou P, Enders TA, Myers ZA, et al. Prediction of conserved and variable heat and cold stress response in maize using *cis*-regulatory information [J]. Plant Cell, 2022, 34(1): 514-534.

[9] Li ZX, Howell SH. Heat stress responses and thermotolerance in maize [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2): 948.

[10] Liang ZK, Myers ZA, Petrella D, et al. Mapping responsive genomic elements to heat stress in a maize diversity panel [J]. Genome Biol, 2022, 23: 234.

[11] Zhao XC, Wei JP, He L, et al. Identification of fatty acid desaturases in maize and their differential responses to low and high temperature [J]. Genes, 2019, 10(6): 445.

[12] Wang J, Chen L, Long Y, et al. A novel heat shock transcription factor (ZmHsf08) negatively regulates salt and drought stress

responses in maize [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(21): 11922.

[13] Li Z, Li ZR, Ji YL, et al. The heat shock factor 20-HSF4-cellulose synthase A2 module regulates heat stress tolerance in maize [J]. Plant Cell, 2024, 36(7): 2652-2667.

[14] Li ZX, Tang J, Srivastava R, et al. The transcription factor bZIP60 links the unfolded protein response to the heat stress response in maize [J]. Plant Cell, 2020, 32(11): 3559-3575.

[15] 武炳瑾. 热胁迫下调控小麦籽粒蛋白表达的因素 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
Wu BJ. Factors regulating protein expression in wheat grains under heat stress [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2021.

[16] Gu L, Jiang T, Zhang CX, et al. Maize HSFA2 and HSBP2 antagonistically modulate raffinose biosynthesis and heat tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2019, 100(1): 128-142.

[17] Du Z, Zhou X, Ling Y, et al. agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(suppl_2): W64-W70.

[18] Tian T, Liu Y, Yan HY, et al. agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W122-W129.

[19] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. Genome Res, 2003, 13(11): 2498-2504.

[20] Erenstein O, Jaleta M, Sonder K, et al. Global maize production, consumption and trade: trends and R&D implications [J]. Food Sec, 2022, 14(5): 1295-1319.

[21] Waqas MA, Wang XK, Zafar SA, et al. Thermal stresses in maize: effects and management strategies [J]. Plants, 2021, 10(2): 293.

[22] 闫恒宇, 李朝霞, 李玉斌. 高温对玉米生长的影响及中国耐高温玉米筛选研究进展 [J]. 植物学报, 2024, 59(6): 1007-1023.
Yan HY, Li ZX, Li YB. Research progress on heat stress impact on maize growth and heat-tolerant maize screening in China [J]. Bull Bot, 2024, 59(6): 1007-1023.

[23] 霍治国, 张海燕, 李春晖, 等. 中国玉米高温热害研究进展 [J]. 应用气象学报, 2023, 34(1): 1-14.
Huo ZG, Zhang HY, Li CH, et al. Review on high temperature heat damage of maize in China [J]. J Appl Meteor Sci, 2023, 34(1): 1-14.

[24] 闫振华, 刘东尧, 贾绪存, 等. 花期高温干旱对玉米雄穗发育、生理特性和产量影响 [J]. 中国农业科学, 2021, 54(17): 3592-3608.
Yan ZH, Liu DY, Jia XC, et al. Maize tassel development, physiological traits and yield under heat and drought stress during flowering stage [J]. Sci Agric Sin, 2021, 54(17): 3592-3608.

[25] Zhao W, Langfelder P, Fuller T, et al. Weighted gene coexpression network analysis: state of the art [J]. J Biopharm Stat, 2010, 20(2): 281-300.

[26] 秦天元, 孙超, 毕真真, 等. 基于WGCNA的马铃薯根系抗旱相关共表达模块鉴定和核心基因发掘 [J]. 作物学报, 2020, 46(7): 1033--1051.
Qin TY, Sun C, Bi ZZ, et al. Identification of drought-related co-expression modules and hub genes in potato roots based on WGCNA [J]. Acta Agron Sin, 2020, 46(7): 1033-1051.

[27] 郑晨璐, 王倩颖, 陆丹迎, 等. 高温胁迫下景宁木兰淀粉与蔗糖代谢途径转录分析 [J]. 浙江农林大学学报, 2023, 40(1): 55-63.
Zheng CL, Wang QY, Lu DY, et al. Transcriptional analysis of starch and sucrose metabolism pathways in *Magnolia sinostellata* under heat stress [J]. J Zhejiang A&F Univ, 2023, 40(1): 55-63.

[28] Magwanga RO, Lu P, Kirungu JN, et al. Knockdown of cytochrome P450 genes *Gh_D07G1197* and *Gh_A13G2057* on chromosomes D07 and A13 reveals their putative role in enhancing drought and salt stress tolerance in *Gossypium hirsutum* [J]. Genes, 2019, 10(3): 226.

[29] Kan Y, Mu XR, Zhang H, et al. TT2 controls rice thermotolerance through SCT1-dependent alteration of wax biosynthesis [J]. Nat Plants, 2022, 8(1): 53-67.

[30] Kim M, Schulz V, Brings L, et al. mTERF18 and ATAD3 are required for mitochondrial nucleoid structure and their disruption confers heat tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. New Phytol, 2021, 232(5): 2026-2042.

[31] Sharma N, Chaudhary C, Khurana P. Wheat Myo-inositol phosphate synthase influences plant growth and stress responses via ethylene mediated signaling [J]. Sci Rep, 2020, 10: 10766.

[32] Kong GZ, Li H, Zheng JT, et al. PgMYB96 enhances *Physalis grisea* high temperature tolerance by activating trithorax-like factor WD REPEAT CONTAINING5b [J]. J Exp Bot, 2025, 76(12): 3527-3542.

（责任编辑 李楠）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):67-76

谷子*SiGeBP*基因家族生物信息学及表达分析

曹海艳[1] 张子彤[1] 孟子钰[1] 宋继策[2] 郝雪峰[1] 金竹萍[2*]
（1.太原师范学院生物科学与技术学院，晋中 030619；2.山西大学生命科学学院，太原 030032）

摘 要：【目的】无表皮毛增强子结合蛋白（glabrous-enbancer binding protein, GeBP）是植物特有的转录调控因子，参与生长发育调控及逆境胁迫应答。明确谷子*SiGeBP*基因家族的成员组成、分子特征及表达响应模式，为解析该家族基因功能奠定基础。【方法】以谷子为试材，利用TBtools、MEGA 11.0、PlantCARE等生物信息学工具及NCBI、Pfam等相关数据库，鉴定*SiGeBP*基因家族成员，并系统分析其染色体定位、理化性质、系统发育关系、蛋白结构、基因结构和顺式作用元件；采用RT-qPCR技术，检测部分家族基因在4种非生物胁迫和4种激素处理下的表达特征。【结果】鉴定到16个*SiGeBP*基因，不均匀地分布在8条染色体上。理化性质分析表明，SiGeBP蛋白均为不稳定性亲水蛋白，具有较高热稳定性，9个成员为偏碱性蛋白。基因结构分析显示，*SiGeBP*基因含0-2个内含子，呈典型“内含子缺乏型”特征。经系统发育分析，将16个SiGeBP蛋白划分为5个亚家族，同一亚家族成员具有高度相似的蛋白保守基序和功能结构域，所有成员均含DUF573结构域。顺式作用元件预测发现，*SiGeBP*基因启动子区域富集多种非生物胁迫响应元件及激素应答元件。RT-qPCR结果显示，*SiGeBP*基因家族成员在非生物胁迫与外源激素处理下，相较于对照组均呈现显著差异化表达：*SiGeBP-1*和*SiGeBP-2*的相对表达水平在4种激素处理下均显著升高；*SiGeBP-6*和*SiGeBP-13*的表达水平在4种非生物胁迫处理下均显著下调。【结论】谷子*SiGeBP*基因家族具有保守的结构特征及多样的表达响应模式，推测其可能通过参与激素调控网络及逆境应答通路，协同调控谷子抗逆性及生长发育进程。

关键词： 谷子；*SiGeBP*基因家族；生物信息学分析；非生物胁迫；激素
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1439

Bioinformatic and Expression Analysis of the *SiGeBP* Gene Family in *Setaria italica*

CAO Hai-yan[1] ZHANG Zi-tong[1] MENG Zi-yu[1] SONG Ji-ce[2] HAO Xue-feng[1] JIN Zhu-ping[2*]
（1. *College of Biological and Technology, Taiyuan Normal University, Jinzhong* 030619; 2. *College of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan* 030032）

Abstract:【Objective】Glabrous-enhancer binding proteins (GeBPs) are a class of plant-specific transcriptional regulators that participate in the regulation of growth and development and the responses to abiotic stress. This study aimed to clarify the member composition, molecular characteristics, and expression response patterns of the *SiGeBP* gene family in *Setaria italica*, thereby laying a foundation for elucidating the functions of this gene family.【Method】*S. italica* was used as the experimental material. Bioinformatics tools, including TBtools, MEGA 11.0, and PlantCARE, together with relevant databases such as NCBI and Pfam, were employed to identify the members of the *SiGeBP* gene family, followed by systematic analyses of their chromosomal localization, physicochemical properties, phylogenetic relationships, protein conserved motifs, functional domains, gene structures, and *cis*-acting elements. Additionally, quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed to detect the expression characteristics of the *SiGeBP* gene family under four types of abiotic stress and four types of hormone treatment conditions.【Result】A total of 16 *SiGeBP* genes were identified and they unevenly distributed across 8 chromosomes. Physicochemical property analysis revealed that all SiGeBP proteins were unstable hydrophilic proteins with high thermal stability, and 9 members were alkaline proteins. Gene structure analysis indicated that *SiGeBP* genes contained 0-2 introns, exhibiting a typical intron-poor feature. Phylogenetic

收稿日期：2025-12-28
基金项目：山西省基础研究计划（202403021212063，202503021211222），山西大学杏花村学院开放基金项目（XCSXU-KF-202401）
*通信作者：金竹萍 jinzhuping@sxu.edu.cn

analysis clustered the 16 SiGeBP proteins into 5 subfamilies. Members within the same subfamily shared highly similar conserved motifs and functional domains, and all members possessed the DUF573 domain. The prediction of *cis*-acting elements showed that the promoter regions of *SiGeBP* genes were enriched with various abiotic stress-responsive elements and hormone-responsive elements. RT-qPCR results demonstrated that members of the *SiGeBP* gene family exhibited significant differential expression patterns, compared with the control group under abiotic stresses and exogenous hormone treatments; the relative expressions of *SiGeBP-1* and *SiGeBP-2* were significantly upregulated under all four hormone treatments; the expressions of *SiGeBP-6* and *SiGeBP-13* were significantly downregulated under all four abiotic stresses.【Conclusion】The *SiGeBP* gene family in *S. italica* exhibits conserved structural characteristics and diverse expression response patterns, implying that it may synergistically regulate the stress resistance and growth and development processes of *S. italica* by participating in hormone regulatory networks and stress response pathways.

Keywords: *Setaria italica*; *SiGeBP* gene family; bioinformation analysis; abiotic stresses; hormones

植物表皮毛是植物体表特化的表皮细胞突起，可显著增加植株体表机械厚度。作为植物抵御逆境的第一道屏障，其在生物与非生物胁迫响应中起着关键作用[1-2]。表皮毛既能通过物理阻隔与化学防御双重机制抵御食草动物、昆虫及病原体的侵害[3-4]，又可有效减轻紫外线对叶肉细胞的辐射损伤，并增强植株对高温、干旱等极端环境的耐受性[5-6]。此外，表皮毛还参与植物生长发育进程：通过增加植物体表面积，提高植物摄取水分和吸收营养的能力，同时降低蒸腾失水[7-8]；部分类型可合成、储存或分泌多种次生代谢产物，以保障自身生长发育需求[9-10]；同时在植物的光合作用、蒸腾作用及呼吸作用等基础生理过程中扮演不可或缺的角色[11-12]。

2003年，Curaba等[13]首次从拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）中分离鉴定出无表皮毛增强子结合蛋白（glabrous-enhancer binding protein, GeBP），由此确立了一个植物特有的转录因子家族。*GeBP*基因家族成员均含有高度保守的中央DNA结合结构域，同时具备碱性氨基酸富集区与亮氨酸拉链基序两大关键功能域；与典型亮氨酸拉链转录因子不同，2个保守结构域间存在超过9个氨基酸残基的间隔序列，这一独特的空间排布特征使其被界定为非典型亮氨酸拉链转录因子[13-14]。目前，关于*GeBP*基因家族的研究已在多种植物中展开，红树莓中鉴定出3个成员[15]，蓖麻中有4个[16]，大豆和拟南芥中则分别鉴定出9[17]和23个[18]。

作为植物生理调控网络的关键成员，*GeBP*基因在介导植株生长发育进程、维持内源激素稳态及介导非生物胁迫响应中发挥着重要作用。拟南芥*GeBP*基因的转录受*KNAT1*基因激活调控，其编码蛋白定位于细胞核并与*GL1*的增强子区域特异性结合，进而抑制叶片细胞命运分化[13]。拟南芥*GeBP*基因家族通过拮抗细胞分裂素响应调控因子（*ARRs*）的负反馈调控作用，激活细胞分裂素介导的生理应答[14]。拟南芥GeBP-lIKE 4（GPL4）能够调控植株根系向根际未污染区域定向生长，从而避免有毒金属的毒害作用[19]。以细菌性黑斑病和胶孢炭疽菌侵染杧果（*Mangifera indica*）植株，检测发现*MiGeBP*基因家族成员在病原菌胁迫过程中呈现差异化表达模式，表明该基因家族广泛参与杧果的免疫应答调控过程[20]。

谷子（*Setaria italica*）俗称粟，是禾本科作物中兼具传统优势与生产价值的代表性物种，在我国农业生产体系中占据重要地位[21-22]。尽管谷子具备一定的抗逆潜力，但盐碱、极端温度等非生物胁迫仍导致其生长受阻、品质下降及产量锐减[23-24]。因此，系统阐明谷子抗逆调控的分子机制，对于精准改良其抗逆性及保障产质量稳定性具有重要的理论支撑与实践指导意义。

本研究以谷子为材料，应用生物信息学技术对谷子*SiGeBP*基因家族进行全基因组鉴定，并对其染色体定位、蛋白理化性质、功能结构域、保守基序、基因结构、系统进化关系、启动子顺式作用元件等进行分析，旨在初步解析*SiGeBP*基因家族的生物学功能，为谷子基因功能的深入挖掘提供理论线索，为谷子优良性状相关基因的筛选与利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为谷子（*Setaria italica*）品种晋谷21号，

前期培育、处理及取样均在太原师范学院生物科学与技术学院植物组织培养间完成。培养环境参数设定为恒温22 ℃，相对湿度40%-60%，光周期16 h光照/8 h黑暗[25]，光照强度12 000 lx。

选取长势一致的2周龄健壮幼苗作为供试材料，随机分为3组，各组处理方案如下：对照组：室温下常规水培；非生物胁迫组：分别模拟4种胁迫处理，即低温（4 ℃恒温培养箱）[26]、高温（37 ℃恒温培养箱）、干旱（控水）和盐（100 mmol/L NaCl溶液）胁迫处理；激素处理组：分别对幼苗进行叶面喷施处理，所用激素及浓度为100 μmol/L 6-BA（细胞分裂素）、200 μmol/L 2,4-D（生长素）、100 μmol/L GA_3（赤霉素）[26]和100 μmol/L乙烯利溶液[26]。处理后0、1、3、6、9和12 h，统一取样，液氮速冻，-80 ℃保存备用。

1.2　*方法*

1.2.1　相关序列获取　从Ensembl Plants数据库（https://plants.ensembl.org/index.html）下载豫谷1号基因组数据（Setaria_italica_v2.0）；通过查阅相关文献，获取拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）GeBP家族成员基因ID[20]，并利用TBtools软件的“NCBI Sequence Download（Basic）”工具提取相应蛋白序列；从PlantTFDB网站（https://planttfdb.gao-lab.org/）下载水稻（*Oryza sativa* L.）GeBP蛋白序列文件。

1.2.2　谷子*SiGeBP*基因家族成员的鉴定及染色体定位　从Pfam数据库（http://pfam.xfam.org，现整合于InterPro平台）下载*GeBP*基因家族的HMM模型文件（PF04504），采用hmmsearch程序（$E < 1e^{-5}$）进行初步鉴定；以拟南芥GeBP家族蛋白作为靶标序列，与谷子基因组进行BLASTp比对（$E < 1e^{-5}$），进行二次鉴定。整合上述2种方法的鉴定结果并去除冗余序列，最终确定谷子*SiGeBP*基因家族候选成员。将谷子基因组gff3文件导入TBtools软件，利用“Gene Density Profile”工具生成基因密度文件；将gff3文件和基因密度文件共同提交至“Gene Location Visualize from GTF/GFF”工具，完成基因染色体定位的可视化分析。依据各基因所在染色体的编号顺序（Chr1-Chrn）及其在同一染色体上由短臂向长臂的线性排布，依次将其重命名为*SiGeBP-1*-*SiGeBP-n*。

1.2.3　谷子SiGeBP蛋白的理化性质分析　将鉴定得到的谷子*SiGeBP*基因家族全长编码蛋白序列（FASTA格式）提交至ExPASy平台的ProtParam工具（http://web.expasy.org/protparam/），分析其核心理化性质，包括氨基酸数量、分子质量、理论等电点（pI）、不稳定性指数、脂肪族指数及总平均亲水性（grand average of hydropathicity, GRAVY）；利用Wolf PSORT网站（https://wolfpsort.hgc.jp/）进行亚细胞定位预测，明确SiGeBP蛋白的潜在分布位置。

1.2.4　谷子SiGeBP蛋白系统发育树的构建　将谷子、拟南芥及水稻*GeBP*基因家族的全长蛋白序列共同导入MEGA 11.0软件，经ClustalW算法进行多序列比对，采用最大似然法（maximum likelihood, ML）构建系统发育树（参数设置：自举检验1 000次，其余参数保持默认）；构建完成后导出Newick格式文件，上传至iTOL网站（https://itol.embl.de/）对发育树进行美化。

1.2.5　谷子SiGeBP蛋白的保守基序分析　利用TBtools软件的MEME工具，对谷子*SiGeBP*基因家族全长编码蛋白序列进行保守基序（motif）分析，设置输出motif数量为20，其余参数为默认值。

1.2.6　谷子SiGeBP蛋白的结构域预测　将谷子*SiGeBP*基因家族全长编码蛋白序列提交至NCBI的CD search在线工具（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi），进行保守结构域预测；将预测结果导入TBtools软件进行可视化。

1.2.7　谷子*SiGeBP*基因结构分析　将谷子基因组gff3注释文件提交至TBtools软件，通过“Gene Structure View（from GFF3）”工具提取已鉴定的*SiGeBP*基因家族成员的基因结构信息（包括外显子、内含子及非编码区的位置与长度）；设置可视化参数，生成该家族的基因结构示意图，直观呈现家族成员间的基因结构差异与保守特征。

1.2.8　谷子*SiGeBP*基因的顺式作用元件分析　利用TBtools软件的“Gtf/Gff3 Sequences Extract”工具提取谷子*SiGeBP*基因家族各成员起始密码子上游2 000 bp的启动子序列；将所得序列提交至PlantCARE在线分析平台（https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/），进行顺式作用元件预测；后通过TBtools软件对预测结果进行可视化分析。

1.2.9　谷子*SiGeBP*基因的RT-qPCR分析　利用

Primer 5.0软件设计部分*SiGeBP*基因引物（附表1）。提取谷子幼苗叶片的总RNA，检测RNA的纯度及完整性，反转录成cDNA，进行实时荧光定量PCR（quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR）分析。以*β-actin*为内参，反应体系为ddH_2O 7.2 μL、模板2 μL、上下游引物各0.4 μL、2×HQ SYBR qPCR Mix 10 μL。反应程序为95 ℃ 30 s；95 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s，40个循环。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各基因的相对表达量，利用SPSS软件进行量化分析。设置3次生物学重复和技术重复。

2 结果

2.1 谷子*SiGeBP*基因家族的鉴定及蛋白理化性质分析

通过全基因组鉴定，共获得16个谷子*SiGeBP*基因家族成员。染色体定位分析表明，16个基因不均匀地分布在8条染色体上，依据其在染色体上的物理位置依次命名为*SiGeBP-1*–*SiGeBP-16*（图1）。其中，Chr.1上分布的*SiGeBP*基因数目最多，为5个；Chr.2、Chr.3、Chr.4、Chr.5和Chr.9各分布1个*SiGeBP*基因；Chr.7上有4个*SiGeBP*基因。

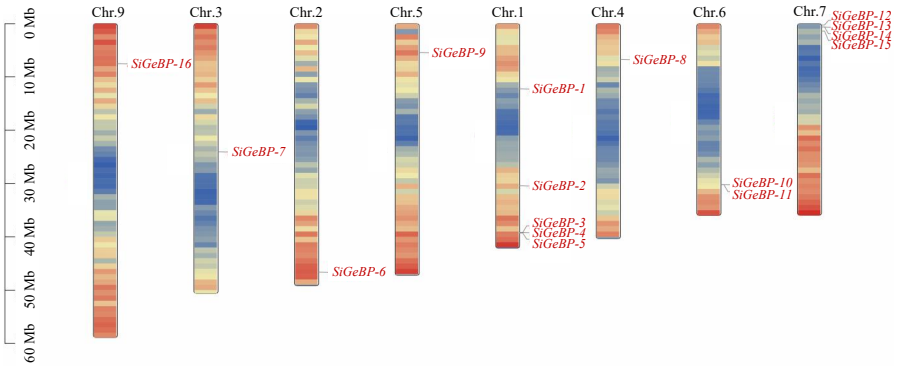


图1 *SiGeBP*基因家族染色体定位

Fig. 1 Chromosomal localization of *SiGeBP* gene family

蛋白理化性质分析结果显示，*SiGeBP*基因家族编码蛋白的氨基酸长度为240（SiGeBP-14）–573（SiGeBP-1）aa；等电点范围为4.73（SiGeBP-5）–11.11（SiGeBP-14），其中，9个成员为偏碱性蛋白，7个为偏酸性蛋白；相对分子质量为26 129.04–61 439.98 Da；不稳定系数为45.47–80.93，表明该家族所有蛋白均为不稳定蛋白；脂肪酸指数为48.23–82.42，具有较高的热稳定性；平均疏水性均为负值，表明该家族蛋白均为亲水性蛋白（附表2）。亚细胞定位预测结果表明，10个SiGeBP蛋白定位于细胞核；4个定位于叶绿体；SiGeBP-8呈现细胞核与线粒体的双重定位模式，SiGeBP-14定位于细胞核和叶绿体（附表2）。

2.2 *SiGeBP*基因家族编码蛋白的系统发育关系分析

为探究谷子*SiGeBP*基因家族蛋白的进化特征，基于谷子、拟南芥和水稻的GeBP蛋白序列构建系统发育树。结果显示（图2），52个GeBP蛋白成员（16个谷子、23个拟南芥、13个水稻蛋白）被划分为I–VII共7个亚家族。其中，SiGeBP蛋白分布于除I、IV外的5个亚家族，且在III亚家族分布最为广泛，有5个蛋白成员；I、IV亚家族为双子叶植物拟南芥GeBP蛋白的特有分支；II、III亚家族为单子叶植物的特有分支；VII亚家族中仅存在1个SiGeBP成员（SiGeBP-14），其余均为拟南芥蛋白。除SiGeBP-14外，其余SiGeBP蛋白均与水稻GeBP蛋白聚为同一分支，表明谷子与水稻GeBP蛋白进化距离较近，亲缘关系更为密切。

2.3 SiGeBP蛋白保守基序及功能结构域预测

通过对*SiGeBP*基因家族编码蛋白的保守基序及蛋白结构域进行系统分析，结果显示，SiGeBP家族蛋白的保守基序数目为2–14个。其中，motif 3和motif 5在所有成员中均有分布，表明这两个基序是该家族的核心保守基序；motif 4、motif 6、motif 7、motif 8、motif 13为II亚家族SiGeBP蛋白特有基序，

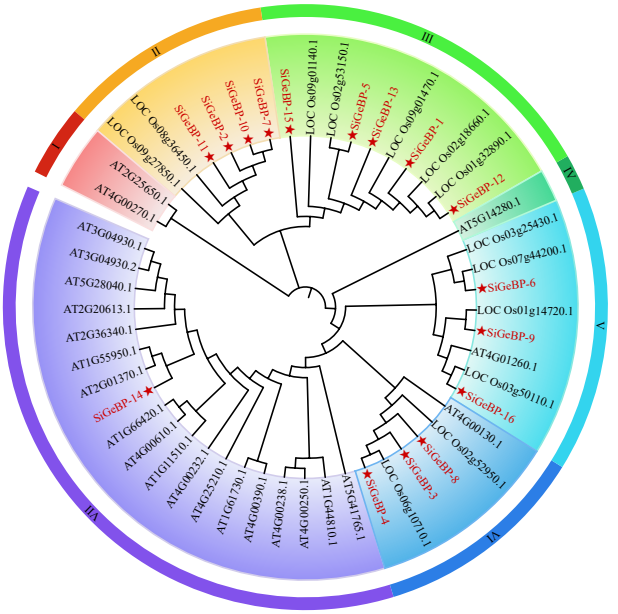


图2　谷子、拟南芥、水稻GeBP蛋白的系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree of GeBP proteins from *Setaria italica*, *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*

motif 12为III亚家族特有（图3-A）。结构域预测结果显示，所有SiGeBP蛋白均含有DUF573保守结构域（图3-B）；进一步对比分析表明，该结构域主要由motif 3和motif 5构成（图3-A）。除此之外，PHA03307 superfamily结构域仅存在于SiGeBP-10，kgd superfamily结构域为SiGeBP-13所特有（图3-B）。同一亚家族SiGeBP蛋白的保守基序组成与蛋白结构域特征均呈现高度保守性；而不同亚家族成员间的蛋白结构组成存在显著差异（图3），该特征与系统发育树聚类结果一致（图2）。

2.4　*SiGeBP*基因家族基因结构预测

为明确*SiGeBP*基因家族的外显子–内含子组成特征，利用TBtools软件绘制其基因结构图。结果显示（图4），*SiGeBP*基因家族成员的内含子数目存在差异，范围为0–2个：其中，11个基因无内含子，3个基因（*SiGeBP-1*、*SiGeBP-3*、*SiGeBP-7*）各含1个内含子，*SiGeBP-8*与*SiGeBP-13*各含有2个内含子。

2.5　*SiGeBP*基因家族顺式作用元件分析

通过对*SiGeBP*基因家族启动子序列进行分析，剔除TATA-box、CAAT-box等核心基础元件及未命名冗余元件，聚焦具有特定功能的顺式作用元件。结果显示（图5），*SiGeBP*基因家族启动子区域富集多种响应元件，可归为6类，分别为发育与代谢调控类（如花青素生物合成元件）、非生物胁迫响应类（如干旱、盐胁迫响应元件）、生物胁迫与防御响应类（如病原菌响应元件）、激素应答类（如生长素、赤霉素、脱落酸相关元件）、光响应与昼夜节律类、转录因子结合类（如MYB、MYC转录因子结合元件）顺式作用元件。

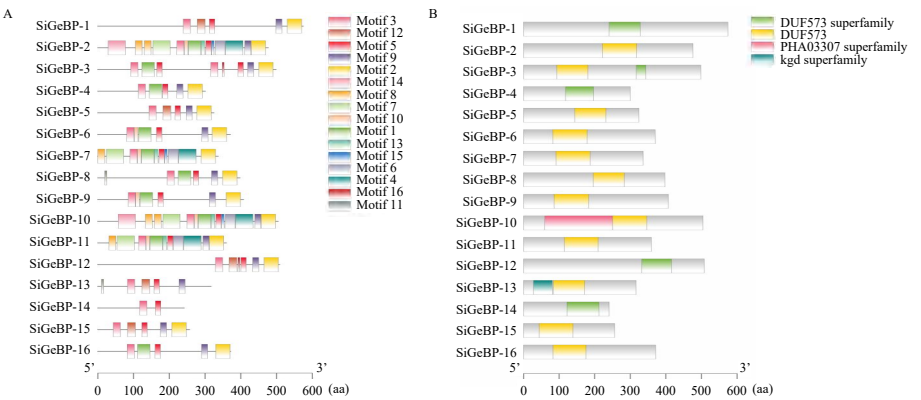


图3　SiGeBP蛋白保守基序（A）及功能结构域预测（B）

Fig. 3　Prediction of conserved motifs (A) and functional domain (B) of SiGeBP proteins

2.6　*SiGeBP*基因家族在非生物胁迫下的表达模式分析

为探究*SiGeBP*基因家族响应非生物胁迫的表达模式与调控机制，结合系统发育分析结果，从该家族核心亚家族中各选取2个成员作为候选基因，进行RT-qPCR分析，以全面反映家族整体及不同亚家

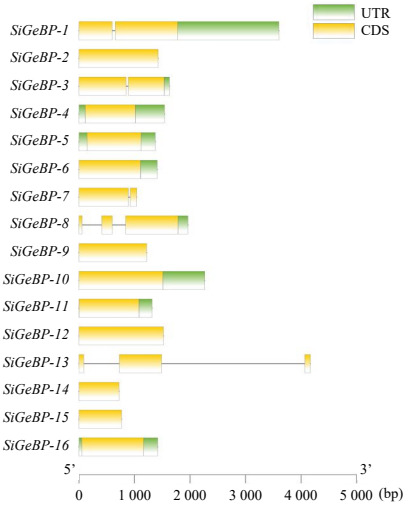


图4 谷子*SiGeBP*基因家族基因结构预测

Fig. 4 Prediction of gene structure of *SiGeBP* gene family in *S. italica*

族成员的胁迫响应特征。具体候选基因如下：*SiGeBP-2*与*SiGeBP-10*（Ⅱ亚家族）、*SiGeBP-1*与*SiGeBP-13*（Ⅲ亚家族）、*SiGeBP-6*与*SiGeBP-9*（Ⅴ亚家族）、*SiGeBP-4*与*SiGeBP-8*（Ⅵ亚家族）。

RT-qPCR结果显示，与对照组相比，*SiGeBP-1*、*SiGeBP-2*、*SiGeBP-8*、*SiGeBP-9*和*SiGeBP-10*呈现一致的表达响应趋势，其转录水平均在低温胁迫处理下显著下调，在高温、干旱及盐胁迫处理下显著上调；*SiGeBP-4*的相对表达水平在低温、高温胁迫下显著降低，在干旱、盐胁迫下显著上升；*SiGeBP-6*与*SiGeBP-13*的表达水平在4种非生物胁迫处理下均呈显著下调趋势（图6）。综上所述，*SiGeBP*基因家族不同成员对非生物胁迫的应答存在显著特异性，呈现出差异化的表达调控模式。

2.7 *SiGeBP*基因家族在激素处理下的表达分析

通过对谷子幼苗进行模拟细胞分裂素（6-BA）、赤霉素（GA_3）、生长素（2,4-D）、乙烯利4种外源激素处理，采用RT-qPCR技术检测候选基因的转录水平。结果表明，经4种激素处理后，*SiGeBP-1*、*SiGeBP-2*的相对表达水平均显著升高，12 h时达对照组的7倍；细胞分裂素、赤霉素显著下调*SiGeBP-4*和*SiGeBP-6*的表达，生长素、乙烯利显著上调其表达；*SiGeBP-8*、*SiGeBP-9*、*SiGeBP-10*为4种激素处理下的显著上调基因；*SiGeBP-13*为4种激素处理下的显著下调基因（图7）。*SiGeBP*基因家族不同成员对外源激素的诱导响应存在显著分化，呈现出明显的激素特异性表达模式特征。

3 讨论

通过全基因组鉴定，本研究共获得16个谷子*SiGeBP*基因家族成员，基于染色体定位信息命名。通过多维度分析，揭示该家族在结构上高度保守、在定位上具有多样性、在进化上呈现单子叶植物特异性的特征，为解析其在激素信号通路与逆境胁迫应答交叉调控网络中的功能提供了关键线索。

生物信息学预测表明，SiGeBP家族蛋白的理化性质与其转录因子功能高度匹配。所有成员均为不稳定的亲水蛋白，有利于细胞核内快速响应信号；同时，该家族蛋白普遍具有较高的热稳定性，且9个成员为偏碱性，为其结合DNA提供了结构基础。亚细胞定位预测进一步揭示该家族功能具有多样性。其中10个成员仅定位于细胞核，符合典型转录因子特征；SiGeBP-14被预测为细胞核–叶绿体双重定位模式，与已报道的甘蓝型油菜同源蛋白一致[27]，另有4个成员仅位于叶绿体，推测该类蛋白可能参与叶绿体相关基因表达；而SiGeBP-8则呈现细胞核–线粒体共定位，与拟南芥同源蛋白AT1G11510相似[18]，暗示其可能在线粒体能量代谢及氧化应激中发挥作用。以上结果为解析SiGeBP在核基因调控及核–质信号通讯中的潜在多重角色提供了重要线索。

系统发育与结构分析预测显示，16个SiGeBP蛋白可划分为5个亚家族，且与水稻GeBP蛋白聚类关系更为紧密，表明该家族在单子叶植物中功能保守。同一亚家族成员具有高度相似的基序组成与结构特征。所有成员均含有motif 3和motif 5，二者共同构成GeBP家族典型的DUF573结构域，该结构域已被证实是家族成员结合DNA的核心功能区域[17-18]。此外，部分亚家族特有的基序（如motif 12）及结构域（如PHA03307、kgd等）的存在，可能是推动亚家族功能分化的重要分子基础。基因结构分析发现，*SiGeBP*家族呈现典型的“内含子缺乏型”特征，其成员所含内含子数目为0–2个，且11个成员不含内含子，这与蓖麻（*Ricinus communis* L.）、大豆（*Glycin max*）、拟南芥、毛果杨（*Populus trichocarpa*）等多个物种中GeBP家族的特征高度一致[16-18, 28]。该

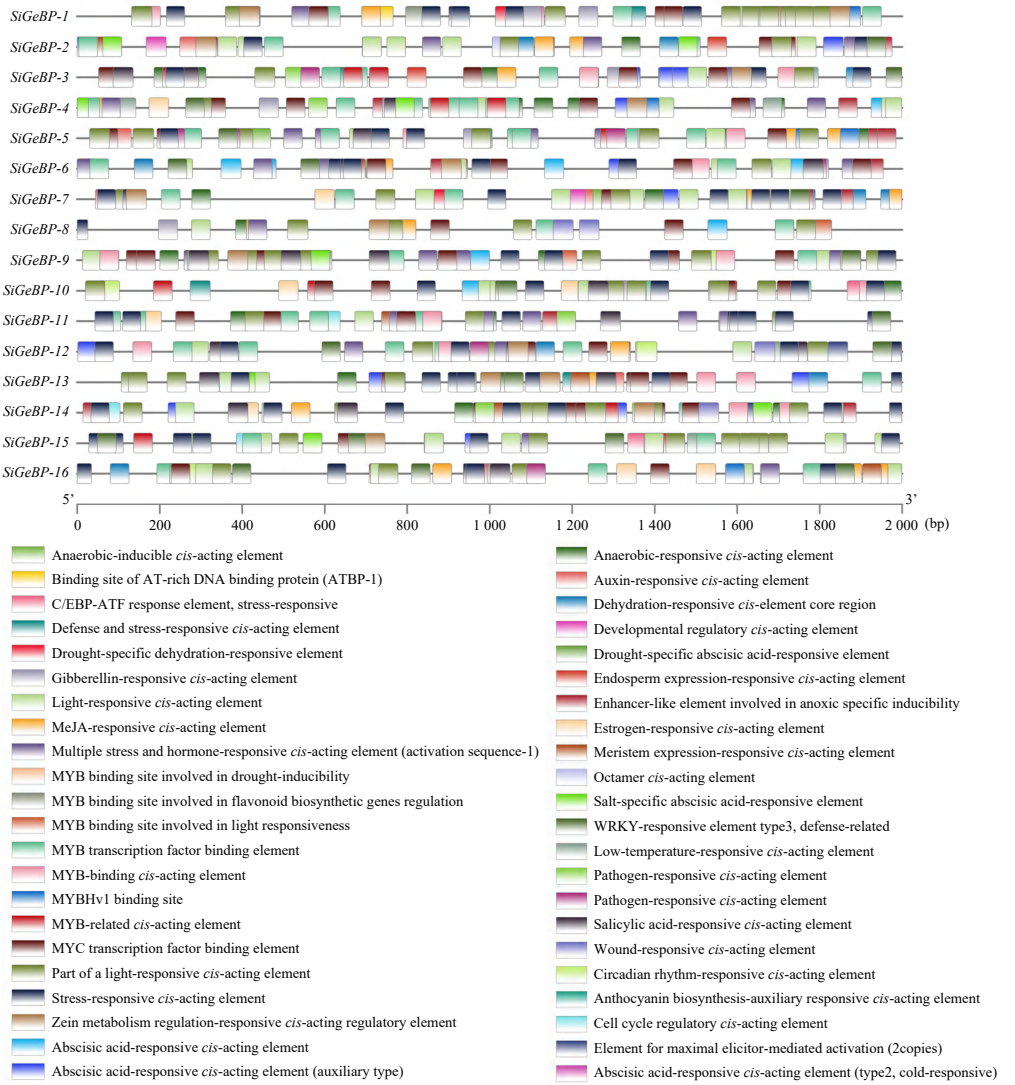


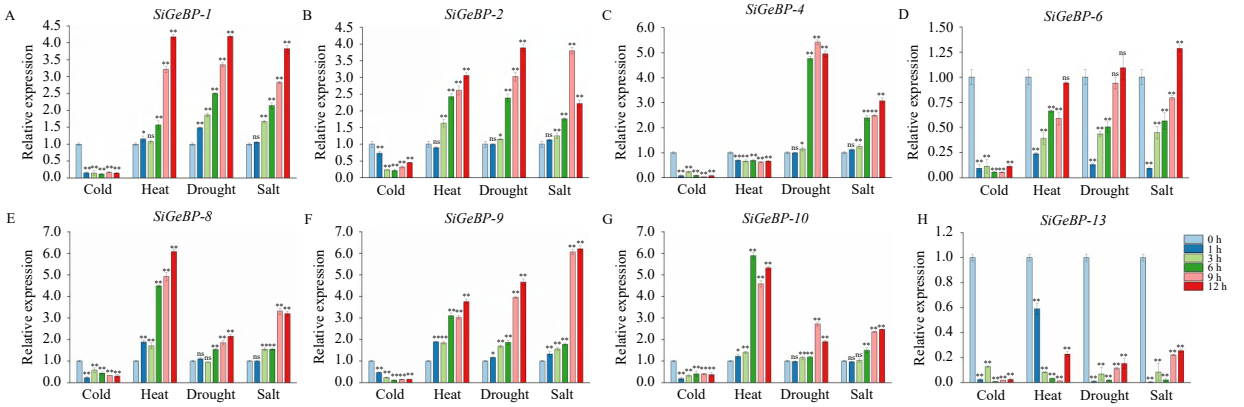
图5　谷子*SiGeBP*基因家族的顺式作用元件分析

Fig. 5　Analysis of *cis*-acting elements of the *SiGeBP* gene family in *S. italica*

结构特征可能有利于基因在胁迫条件下被快速诱导转录[29-30]，从进化角度支持了SiGeBP作为胁迫响应转录因子的潜在功能。

启动子区域的预测分析发现，*SiGeBP*基因不仅富含脱落酸、茉莉酸甲酯等激素响应元件及干旱、低温等非生物胁迫响应元件，其序列特征与蓖麻[16]、甘蓝型油菜[27]、白菜[31]和番茄[32]等物种中GeBP家族的报告相符，从序列层面支持了该家族功能在物种间的保守性。此外，预测结果还显示部分成员含有胚乳表达、分生组织表达及玉米醇溶蛋白代谢调控等组织特异性响应元件，其中，*SiGeBP-2*与*SiGeBP-3*含有胚乳表达响应元件；*SiGeBP-2*、*SiGeBP-6*、*SiGeBP-9*、*SiGeBP-11*、*SiGeBP-13*、*SiGeBP-14*、*SiGeBP-16*含分生组织表达响应元件；另有13个成员启动子中含有玉米醇溶蛋白代谢调控元件，该元件通常与胚乳特异性表达相关。以上结果表明，*SiGeBP*基因除可能参与胁迫响应外，还可能调控谷子的胚乳发育、分生组织功能等特定生长发育过程。

RT-qPCR分析*SiGeBP*基因在非生物胁迫及外源激素处理下的表达模式。结果表明，家族成员的表达模式呈现多样化，且与启动子中顺式作用元件分布高度吻合。其中，*SiGeBP-1*、*SiGeBP-8*、*SiGeBP-9*、



*:在*P*<0.05水平差异显著,**:在*P*<0.01水平差异极显著,ns:差异不显著。下同

*: Significant difference at the *P*<0.05 level. **: Highly significant difference at the *P*<0.01 level. ns: No significant difference. The same below

图6 *SiGeBP*基因家族在非生物胁迫下的表达模式分析

Fig. 6 Expression pattern analysis of the *SiGeBP* gene family under abiotic stresses

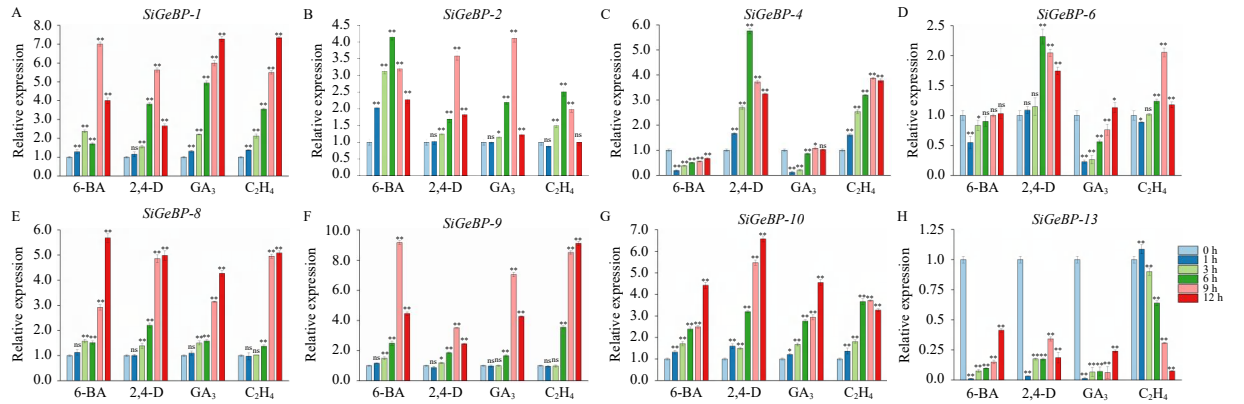


图7 *SiGeBP*基因家族在外源激素处理下的表达模式分析

Fig. 7 Expression pattern analysis of the *SiGeBP* gene family under exogenous hormone treatments

*SiGeBP-10*在非生物胁迫与激素处理下表现出相似的诱导趋势，这与番茄*SlGeBP*家族中报道的“激素–胁迫协同响应”模式[32]相似，表明这些基因可能作为信号整合节点，协同调控逆境应答。与之相对，*SiGeBP-4*和*SiGeBP-6*等成员在不同处理间的响应模式存在明显差异，反映了该家族在进化过程中可能发生了功能分化。综合生物信息学预测与试验验证结果，推测*SiGeBP*基因家族在谷子中扮演多重角色：一方面，通过保守的胁迫与激素应答元件响应环境信号；另一方面，借助特异性的启动子元件组合，使不同成员差异化地参与特定发育过程或信号通路。这种“保守应答”与“特异分化”相结合的模式，与棉花*CIPK6*、水稻*COG4-OsbZIP23*等基因家族通过功能分化增强环境适应性的策略类似[33-34]，可能是谷子平衡生长发育与逆境抗性的重要调控机制。

综上所述，*SiGeBP*基因家族成员在响应外源激素与非生物胁迫时，表现出明显的表达特异性和协同性，表明该家族在谷子的逆境应答与激素信号调控网络中具有重要功能。本研究结果为后续深入揭示其介导抗逆性的分子机制提供了关键依据。

4 结论

在谷子中共鉴定出16个*SiGeBP*基因家族成员，分布在8条染色体上，可划分为5个亚家族，其在基因结构、蛋白保守基序与功能结构域上高度保守。该家族基因含有多种非生物胁迫及激素应答顺式

作用元件。*SiGeBP*基因的表达受干旱、盐、低温等多种非生物胁迫及多种外源激素的显著诱导，表明该家族在谷子逆境应答及生长发育调控中发挥重要作用。

文章所有附表数据请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260508110517_NewsFile_78.pdf）。

参考文献

[1] 钟姗辰, 武舒, 王黎, 等. 植物毛状体研究进展 [J]. 分子植物育种, 2023, 21(21): 7215-7224.
Zhong SC, Wu S, Wang L, et al. Advances in molecular mechanisms of plant trichomonas [J]. Mol Plant Breed, 2023, 21(21): 7215-7224.

[2] 韩金凤, 夏天, 刘一华, 等. 基因调控植物表皮毛发育的研究进展 [J]. 植物生理学报, 2023, 59(8): 1517-1523.
Han JF, Xia T, Liu YH, et al. Research progress on gene regulation of plant trichome development [J]. Plant Physiol J, 2023, 59(8): 1517-1523.

[3] Yang SL, Xue SD, Shan L, et al. The CsTM alters multicellular trichome morphology and enhances resistance against aphid by interacting with CsTIP1;1 in cucumber [J]. J Adv Res, 2025, 69: 17-30.

[4] Heng SP, Li XL, Li M, et al. Two novel alleles of the MYB transcription factor *BjA06.GL1* and *BjB02.GL1* control leaf trichomes and enhance resistance to aphids in *Brassica juncea* [J]. Hortic Res, 2025, 12(2): uhae314.

[5] Lan JQ, Zhang JZ, Yuan RR, et al. TCP transcription factors suppress *Cotyledon* trichomes by impeding a cell differentiation-regulating complex [J]. Plant Physiol, 2021, 186(1): 434-451.

[6] Wu ML, Chang J, Han XQ, et al. A HD-ZIP transcription factor specifies fates of multicellular trichomes via dosage-dependent mechanisms in tomato [J]. Dev Cell, 2023, 58(4): 278-288.

[7] Vanhoutte B, Schenkels L, Ceusters J, et al. Water and nutrient uptake in *Vriesea* cultivars: trichomes vs. roots [J]. Environ Exp Bot, 2017, 136: 21-30.

[8] 阿拉依·哈那提, 刘艳霞, 兰海燕. 荒漠植物表皮毛的凝结水形成及吸收机制研究进展 [J]. 干旱区研究, 2024, 41(1): 114-123.
Hanati A, Liu YX, Lan HY. Research progress on the mechanism of formation, absorption and utilization of condensed water on leaf trichomes of desert plants [J]. Arid Zone Res, 2024, 41(1): 114-123.

[9] 刘晓梦, 唐宁, 陈泽雄, 等. 植物表皮毛发育研究进展 [J]. 园艺学报, 2021, 48(4): 705-718.
Liu XM, Tang N, Chen ZX, et al. Progress in plant trichome development research [J]. Acta Hortic Sin, 2021, 48(4): 705-718.

[10] 崔占虎, 黄显章, 李超, 等. 多组学策略在药用植物表皮毛次生代谢调控中的应用与展望 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(3): 548-554.
Cui ZH, Huang XZ, Li C, et al. Application and prospect of multi-omics in regulation of secondary metabolism of trichome from medicinal plant [J]. Mod Chin Med, 2021, 23(3): 548-554.

[11] Saadat NP, van Aalst M, Brand A, et al. Shifts in carbon partitioning by photosynthetic activity increase terpenoid synthesis in glandular trichomes [J]. Plant J, 2023, 115(6): 1716-1728.

[12] Zekri MA, Lang I. Lack of trichomes and variation in stomata properties influence the quantum efficiency of photosynthesis in *Arabidopsis* [J]. Environ Exp Bot, 2024, 227: 105948.

[13] Curaba J, Herzog M, Vachon G. *GeBP*, the first member of a new gene family in *Arabidopsis*, encodes a nuclear protein with DNA-binding activity and is regulated by *KNAT1* [J]. Plant J, 2003, 33 (2): 305-317.

[14] Chevalier F, Perazza D, Laporte F, et al. GeBP and GeBP-like proteins are noncanonical leucine-zipper transcription factors that regulate cytokinin response in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2008, 146(3): 1142-1154.

[15] 张瑞杰, 李明, 李迎超, 等. 红树莓 *GeBP* 基因家族鉴定及表达分析 [J]. 植物生理学报, 2024, 60(6): 1007-1015.
Zhang RJ, Li M, Li YC, et al. Identification and expression analysis of *GeBP* gene family in red raspberry [J]. Plant Physiol J, 2024, 60(6): 1007-1015.

[16] 朱贵爽, 李艳肖, 张安宁, 等. 蓖麻GeBP转录因子的全基因组鉴定与 *GeBP2* 基因的克隆、表达分析 [J]. 浙江农业学报, 2024, 36(8): 1731-1740.
Zhu GS, Li YX, Zhang AN, et al. Identification of RcGeBP transcription factor and cloning and expression analysis of *RcGeBP2* gene in castor [J]. Acta Agric Zhejiangensis, 2024, 36(8): 1731-1740.

[17] 巩元勇, 赵丽华, 闫飞, 等. 大豆GeBP转录因子基因家族的生物信息学分析 [J]. 广西植物, 2022, 42(2): 294-303.
Gong YY, Zhao LH, Yan F, et al. Bioinformatics analysis of GeBP transcription factor gene family in *Glycin max* [J]. Guihaia, 2022, 42(2): 294-303.

[18] 李鸿燕, 唐泽成, 李嘉欣, 等. 拟南芥GeBP转录因子基因家族生物信息学分析[J]. 分子植物育种, 2024: 1-21.
Li HY, Tang ZC, Li JX, et al. Bioinformatics analysis of the GeBP transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Mol Plant Breed, 2024: 1-21.

[19] Khare D, Mitsuda N, Lee S, et al. Root avoidance of toxic metals requires the GeBP-LIKE 4 transcription factor in *Arabidopsis thaliana* [J]. New Phytol, 2017, 213(3): 1257-1273.

[20] 孙瑞青, 杨楠, 刘志鑫, 等. 杧果GeBP转录因子家族基因的鉴定及表达分析 [J]. 经济林研究, 2021, 39(4): 137-147.
Sun RQ, Yang N, Liu ZX, et al. Identification and expression analysis of mango GeBP transcription factor family genes [J]. Nonwood

For Res, 2021, 39(4): 137-147.

[21] 贾冠清, 刁现民. 中国谷子种业创新现状与未来展望 [J]. 中国农业科学, 2022, 55(4): 653-665.
Jia GQ, Diao XM. Current status and perspectives of innovation studies related to foxtail millet seed industry in China [J]. Sci Agric Sin, 2022, 55(4): 653-665.

[22] 李顺国, 刘斐, 刘猛, 等. 中国谷子产业和种业发展现状与未来展望 [J]. 中国农业科学, 2021, 54(3): 459-470.
Li SG, Liu F, Liu M, et al. Current status and future prospective of foxtail millet production and seed industry in China [J]. Sci Agric Sin, 2021, 54(3): 459-470.

[23] Rathinapriya P, Pandian S, Rakkammal K, et al. The protective effects of polyamines on salinity stress tolerance in foxtail millet (*Setaria italica* L.), an important C_4 model crop [J]. Physiol Mol Biol Plants, 2020, 26(9): 1815-1829.

[24] Zhao XT, Ma K, Li Z, et al. Transcriptome analysis reveals brassinolide signaling pathway control of foxtail millet seedling starch and sucrose metabolism under freezing stress, with implications for growth and development [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(14): 11590.

[25] 王心悦, 陈畅, 李康平, 等. 谷子*HMA*基因家族的全基因组表征及其功能预测 [J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2025, 45(4): 3-15.
Wang XY, Chen C, Li KP, et al. Genome-wide characterization and functional prediction of the heavy metal ATPase (*HMA*) gene family in foxtail millet [J]. J Shanxi Agric Univ Nat Sci Ed, 2025, 45(4): 3-15.

[26] Jing XQ, Deng N, Cai YD. Genome-wide identification and characterization of *RopGEF* gene family in C_4 crops [J]. Genes, 2024, 15(9): 1112.

[27] 贺日升, 肖硕定, 游亮, 等. 甘蓝型油菜*BnGeBP*基因家族的生物信息学分析及表达分析[J]. 分子植物育种, 2025: 1-14.
He RS, Xiao SD, You L, et al. Bioinformatics and expression analysis of the *BnGeBP* gene family in *Brassica napus* [J]. Molecular Plant Breeding, 2025: 1-14.

[28] 邵禹萌, 姚卓尔, 王鑫翌, 等. 毛果杨GeBP转录因子家族鉴定及表达分析 [J]. 林业与生态科学, 2025, 40(4): 389-398.
Shao YM, Yao ZE, Wang XY, et al. Identification and expression analysis of GeBP transcription factor family in *Populus trichocarpa* [J]. For Ecol Sci, 2025, 40(4): 389-398.

[29] Jeffares DC, Penkett CJ, Bähler J. Rapidly regulated genes are intron poor [J]. Trends Genet, 2008, 24(8): 375-378.

[30] Chen Y, Ma T, Zhang TT, et al. Trends in the evolution of intronless genes in Poaceae [J]. Front Plant Sci, 2023, 14: 1065631.

[31] Wang RL, Wu XY, Wang ZW, et al. Genome-wide identification and expression analysis of *BrGeBP* genes reveal their potential roles in cold and drought stress tolerance in *Brassica rapa* [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(17): 13597.

[32] Cao HH, Wang DF, Li XL, et al. Genome-wide identification and expression profiling of *SlGeBP* gene family in response to hormone and abiotic stresses in *Solanum lycopersicum* L. [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(13): 6008.

[33] Sun WN, Xia LJ, Deng JW, et al. Evolution and subfunctionalization of *CIPK6* homologous genes in regulating cotton drought resistance [J]. Nat Commun, 2024, 15: 5733.

[34] Sun SL, Liu DF, Luo W, et al. Domestication-selected COG4-OsbZIP23 module regulates chilling tolerance in rice [J]. Cell Rep, 2024, 43(11): 114965.

（责任编辑　李楠）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):77-87

燕麦盐碱响应基因*AsGolS2*的克隆及互作蛋白的筛选

孙金梁 李星岩 张碧茹 米俊珍* 刘景辉*
（内蒙古农业大学农学院 内蒙古高校燕麦工程研究中心，呼和浩特 010018）

摘 要：【目的】探究燕麦（*Avena Sativa* L.）*AsGolS2*在盐碱胁迫响应中的功能，为阐明其介导的分子调控机制提供依据。【方法】从6个燕麦品种中克隆*AsGolS2*，并进行序列多态性分析。选取代表性品种定莜2号，克隆*AsGolS2*的全长cDNA序列，并进行生物信息学分析，利用RT-qPCR技术分析其叶片在不同浓度盐碱胁迫下*AsGolS2*的表达变化。以盐碱胁迫处理的定莜2号叶片为材料，构建均一化酵母双杂交cDNA文库，并利用该文库筛选AsGolS2的互作蛋白。【结果】多个品种燕麦的序列比对表明，*AsGolS2*的遗传变异主要存在于非翻译区（UTRs）。该基因CDS全长984 bp，由3个外显子构成，编码327个氨基酸，其编码蛋白具有GT8家族保守结构域，无跨膜结构。二级结构预测结果显示，该蛋白由33.03%的α-螺旋、10.70%的延伸链和56.27%的无规则卷曲构成。系统发育分析发现，燕麦AsGolS2与小麦TaGolS2蛋白的亲缘关系最近。RT-qPCR分析结果表明，*AsGolS2*在叶片中的表达受盐碱胁迫显著诱导，且在不同浓度胁迫下均呈先上升后下降的趋势。通过酵母双杂交筛选获得45个AsGolS2互作候选蛋白，其中，参与代谢过程的蛋白占比最高。【结论】成功克隆了燕麦*AsGolS2*，其在叶片中的表达受盐碱胁迫诱导。筛选出45个AsGolS2互作候选蛋白，其功能涉及代谢、信号转导及蛋白质稳态等多个生物学过程。

关键词：燕麦；*AsGOLS2*；盐碱胁迫；生物信息学；互作蛋白
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1333

Cloning of the Saline-alkali Response Gene *AsGolS2* and Screening of Interacting Proteins in Oat

SUN Jin-liang LI Xing-yan ZHANG Bi-ru MI Jun-zhen* LIU Jing-hui*
（*College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Inner Mongolia Oat Engineering Research Center in Higher Education Institutions, Hohhot* 010018）

Abstract: 【Objective】 To investigate the function of the oat (*Avena sativa* L.) *AsGolS2* in response to saline-alkali stress, thereby providing a basis for elucidating the molecular regulatory mechanisms it mediates. 【Method】 The *AsGolS2* gene was cloned from six oat varieties and subjected to sequence polymorphism analysis. The representative variety 'Dingyou 2' was selected for full-length cDNA cloning of *AsGolS2*, followed by bioinformatics analysis. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was employed to examine the expression variations in the leaves under varying concentrations of saline-alkali stress. Additionally, the leaves of 'Dingyou 2' subjected to saline-alkali stress were used to construct a normalized yeast two-hybrid (Y2H) cDNA library, which was subsequently utilized to screen for interacting proteins of AsGolS2. 【Result】 Sequence alignment of multiple oat varieties indicates that genetic variation in the *AsGolS2* gene primarily resides within the untranslated regions (UTRs). The coding sequence (CDS) of *AsGolS2* is 984 bp in length, comprising three exons and encoding 327 amino acids. The resulting protein possesses a conserved domain characteristic of the GT8 family and lacks transmembrane structures. Predicted results of secondary structure indicate that the encoded protein comprises 33.03% α-helices, 10.70% extended chains, and 56.27% disordered coils. Phylogenetic analysis reveals that oat AsGolS2 shares the closest relationship with the wheat TaGolS2 protein. RT-qPCR analysis demonstrates that the expression of the *AsGolS2* in leaves is significantly induced by saline-alkali stress, exhibiting an initial increase followed by a subsequent

收稿日期：2025-12-07
基金项目：燕麦全产业链科技创新团队项目（BR22-12-05），国家燕麦荞麦产业技术体系项目（CARS-07），燕麦联合攻关项目（YZ2023009），内蒙古自治区燕麦工程实验室能力建设项目（BR221023，BR251025）
*通信作者：米俊珍 imaumjz@aliyun.com，刘景辉 cauljh@163.com

decrease across different stress concentrations. Y2H screening identified 45 candidate interacting proteins for AsGolS2, among which proteins involved in metabolic processes constitute the largest proportion.【Conclusion】The *AsGolS2* gene of oat is successfully cloned, with its expression in leaves induced by saline-alkali stress. The 45 candidate proteins interacting with AsGolS2 are identified. Their functions span multiple biological processes, including metabolism, signal transduction, and protein homeostasis.

Keywords: *Avena sativa* L.; *AsGolS2*; saline-alkali stress; bioinformatics; interacting protein

燕麦（*Avena sativa* L.）是禾本科燕麦属粮饲兼用作物，在全球范围广泛种植[1]，其营养价值丰富，尤其以膳食纤维含量高而备受关注[2]。燕麦对盐碱、贫瘠等土壤逆境具有较强的耐受性，能有效提升盐碱化土地利用率[3-4]，具备改良土壤理化性质的生物潜力，常被用于中低产田的生态修复与可持续利用。因此，深入研究燕麦抗逆性的分子机制，揭示其适应盐碱胁迫的遗传与生理基础，对耐盐碱燕麦新品种的选育及土壤改良实践具有重要的理论指导价值。

植物在响应逆境胁迫时，会激活一系列复杂的生理生化适应机制[5]，其中，渗透调节物质的积累是关键的策略之一[6]。棉子糖系列寡糖（raffinose family oligosaccharides, RFOs）作为一类重要的渗透保护剂和活性氧清除剂，在此过程中发挥着重要作用[7-9]。该家族包含棉子糖、水苏糖、毛蕊花糖等多种寡糖，其中，棉子糖是RFOs生物合成的核心前体与典型代表，其合成通路是理解整个家族代谢调控的关键。棉子糖生物合成的第一步是合成肌醇半乳糖苷，即在肌醇半乳糖苷合成酶（galactinol synthase, GolS）催化下，UDP-半乳糖（UDP-Gal）的半乳糖基被转移至肌醇上，生成肌醇半乳糖苷[10]。GolS是棉子糖合成代谢途径的限速酶，被认为是植物抗逆响应中的重要调节因子，通过介导RFOs积累在植物发育、抗逆及代谢调控中发挥关键作用。为应对复杂的胁迫环境，植物中*GolS*通常以多等位基因的形式存在，不同等位基因在表达上呈现高度的胁迫特异性与功能多样性，共同构成胁迫响应网络，从而介导植物对不同逆境胁迫的特异性耐受。拟南芥*AtGolS1*、*AtGolS2*[11]和马铃薯*StGolS4*[12]在干旱或盐胁迫下诱导表达；拟南芥*AtGolS3*[11]、小麦*TaGolS1*、*TaGolS2*[13]和黄瓜*CsGolS1*[14]响应低温胁迫而上调表达，其中，黄瓜*CsGolS1*通过促进RFOs积累增强韧皮部运输。此外，转基因研究也为*GolS*的功能提供直接证据。例如，过表达黄瓜*CsGolS4*[15]、马铃薯*ScGolS1*[16]均能提升植株耐寒性；过表达拟南芥*AtGolS1*可增强砷胁迫耐受性[17]；过表达小麦*TaGolS3*通过增强抗氧化防御提高锌耐受性[18]。除在非生物胁迫响应中的核心作用，*GolS*还参与植株的生长发育调控。例如，番茄*SlGolS2*、*SlGolS4*参与果实成熟、株高等发育过程的调控[19-20]。*GolS*的表达受多种转录因子调控，这些转录因子通过结合其启动子区的顺式作用元件以激活转录。例如，矮牵牛*PhZFP1*直接结合*PhGolS1-1*启动子[21]、拟南芥*AtHsfA3*结合*AtGolS1*和*AtGolS2*的启动子[22]，激活其转录，从而提高RFOs含量；水稻DOF转录因子*OsRPBF*通过调控*OsGolS*表达以影响种子活力[23]。GolS的功能实现同样依赖于复杂的蛋白互作网络，该网络的特异性及其调控模式对于阐明其生理功能至关重要[24]。例如，在胁迫响应通路中，小麦TaUSP_3B-1与TaGolS发生特异性互作，二者共同调控内质网应激下的活性氧（reactive oxygen species, ROS）稳态，从而增强细胞胁迫耐受性[25]。综上，*GolS*基因家族通过成员功能的胁迫特异性分化以及表达上的复杂转录与翻译后调控，在植物整合信号、合成渗透保护物质以应对多种非生物胁迫的过程中扮演着核心枢纽角色。

前期研究表明，过表达*AsGolS2*显著增强拟南芥对盐碱胁迫的耐受性，且AsGolS2-GFP融合蛋白在拟南芥原生质体中同时定位于细胞核与细胞质[26]。然而，燕麦*AsGolS2*尚未得到系统解析，在盐碱胁迫下的表达调控机制亦不明确。

本研究首先对燕麦*AsGolS2*进行克隆与生物信息学分析，并验证其在盐碱胁迫下的表达变化，利用酵母双杂交技术筛选与AsGolS2蛋白互作的候选蛋白，为深入阐明*AsGolS2*在燕麦盐碱胁迫响应中的分子调控机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

供试燕麦品种加燕2号、定莜2号、晋燕17号、

白燕2号、白燕5号和草莜1号，均由内蒙古农业大学燕麦产业研究中心保存与提供。选取均匀饱满的种子，经1% NaClO溶液表面消毒10 min，用超纯水冲洗3–5次，置于铺有两层滤纸的培养皿中。培养条件设定为：温度25 ℃，相对湿度70%，于人工气候箱中培养。本研究所用引物序列详见附表1。

1.2　*方法*

1.2.1　燕麦*AsGolS2*的克隆　以前期盐碱胁迫后的燕麦叶片转录组数据Unigene序列Pepsico1_Contig6168.path1为参考[26]，用Primer Premier 5.0软件设计*AsGolS2*特异性引物，基于燕麦基因组数据库（PepsiCo OT3098 Hexaploid Oat v2 pseudomolecules）验证引物序列，使用BLASTN比对，将显著性阈值设定为E值≤$1e^{-1}$，确保引物3′端不存在连续3个或以上碱基与非靶位点完全匹配。分别以耐盐碱品种白燕2号、定莜2号、加燕2号和盐碱敏感品种白燕5号、草莜1号、晋燕17号生长7 d的幼苗叶片为材料[27]，采用CTAB法提取燕麦基因组DNA。以gDNA为模板，进行PCR扩增，检测、回收，与pEASY T1载体连接，并转化*Trans*1-T1感受态细胞。筛选阳性克隆后进行Sanger测序，以验证插入序列的正确性。

1.2.2　燕麦*AsGolS2*基因cDNA的克隆及生物信息学分析　以定莜2号幼苗叶片为材料，提取总RNA，并反转录成cDNA，进行扩增。具体步骤参考1.2.1。利用在线工具对*AsGolS2*进行生物信息学分析（附表2）。

1.2.3　盐碱胁迫处理下燕麦*AsGolS2*的表达分析　以筛选获得的耐盐碱燕麦品种定莜2号为试验材料。选取均匀饱满的种子，经1% NaClO溶液表面消毒10 min，用超纯水冲洗3–5次，置于铺有两层滤纸的培养皿中，于25 ℃、70%相对湿度的人工气候箱中催芽。待种子萌发后，转移至装有1/2 Hoagland营养液的黑色水培盒中，在光照16 h/黑暗8 h、温度25 ℃/18 ℃的条件下培养至二叶一心期。使用75（Y1）和150（Y2）mmol/L（NaCl∶Na_2SO_4∶$NaHCO_3$∶Na_2CO_3的摩尔比=1∶9∶9∶1）的混合盐碱溶液进行胁迫处理，分别于处理0、6、12、24、72和120 h后采集幼苗叶片样品，液氮速冻后-80 ℃保存。提取不同胁迫时间的燕麦叶片RNA，并反转录为cDNA，用*AsGolS2*的qPCR特异性引物进行RT-qPCR分析，以*AsGAPDH*为内参。具体参考Premix Prp Taq HS Qpcr Kit（ROX Plus）试剂盒说明书，每个样品设置3次生物学重复。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算*AsGolS2*的相对表达水平。

1.2.4　酵母双杂交cDNA文库的构建与质量鉴定　从胁迫72 h的各组燕麦幼苗叶片中分别提取总RNA，并纯化，用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性，用分光光度计检测其浓度和纯度。进一步将其反转录成单链cDNA，以其为模板通过长片段PCR扩增获得dscDNA。对均一化后的cDNA进行纯化处理，并使用Clontech CHROMA SPIN™+TE-1000 Columns试剂盒进行小片段去除，与pGADT7载体连接，转化至感受态细胞，得到初级cDNA文库。取10 μL初级文库培养液稀释10 000倍，计算初级文库库容。随机挑选24个克隆进行菌落PCR检测文库质量。

1.2.5　PGBKT7-AsGolS2诱饵载体构建及自激活检测　在*AsGolS2*编码区序列两端分别引入*Eco*R I和*Sal* I酶切位点。经双酶切后，将目的片段与pGBKT7载体连接，构建重组载体，转化，筛选阳性克隆，测序，获得正确的诱饵载体pGBKT7-AsGolS2。将pGBKT7-AsGolS2质粒转化Y2HGold酵母感受态细胞，并涂布于SD-T固体培养基，验证其转化能力。将阴性对照pGBKT7-laminC+pGADT7-largeT、阳性对照pGBKT7-p53+pGADT7-largeT、pGBKT7-AsGols2+pGADT7共转至酵母感受态细胞，将转化产物点在缺陷型固体培养基上进行自激活检测。进一步将其点于添加不同浓度3-AT的SD-TLH固体培养基上，观察自主生长情况。

1.2.6　AsGolS2的互作蛋白筛选及回转验证　采用Clontech酵母双杂交系统，将pGBKT7-AsGols2诱饵质粒与pGADT7载体构建的燕麦cDNA文库质粒共转至AH109酵母感受态细胞，并涂布于含0.25 mmol/L 3-AT的SD-TLH的固体培养基上，以pGBKT7-p53+pGADT7-largeT为阳性对照，对筛选平板上长出的克隆进行划线纯化，观察其生长情况。使用特异性引物，通过菌落PCR扩增酵母阳性克隆中捕获的文库质粒插入片段。PCR产物经纯化后测序，所获序列通过与燕麦基因组数据库（PepsiCo OT3098 Hexaploid Oat v2 pseudomolecules）BLAST比对分析，鉴定潜在的互作蛋白编码基因。为确认互作关系，对

所有经序列分析后的候选阳性克隆进行回转验证。

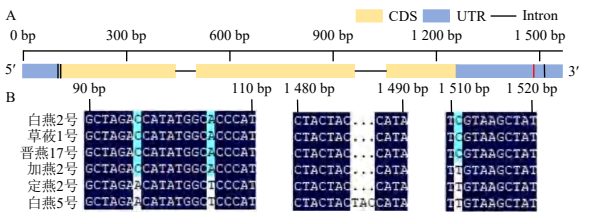
2 结果

2.1 *AsGolS2* 的克隆与分析

通过对6个燕麦品种的叶片gDNA进行扩增，结果显示，所有品种均可扩增出一条约2 000 bp的清晰条带（附图1-A），与预期扩增长度2 394 bp相符。进一步以定莜2号叶片cDNA为模板，使用特异性引物*AsGolS2-F2/R2*进行PCR扩增，获得一条约1 000 bp条带（附图1-B）。经测序，证实其CDS全长为984 bp，与前期转录组数据获得的序列一致。

2.2 *AsGolS2* 的序列多态性分析

为探究*AsGolS2*序列与燕麦盐碱胁迫耐受性之间的遗传变异关系，选取在前期表型鉴定中具有明确对比表型的6个燕麦品种。通过对其进行序列分析，共鉴定出4个变异位点，包括3个单核苷酸变异（SNP）和1个插入缺失（InDel）。其中，仅1个SNP位于编码区，在第1外显子的第6个碱基，密码子为GCA/GCT，对应丙氨酸，未改变氨基酸序列，为同义突变。其余2个变异均位于非翻译区（UTR），分别位于5′-UTR和3′-UTR。此外，白燕5号在3′-UTR第1486位碱基后插入3个碱基（图1-A、B）。



A：多态性位点示意图；黑色竖线代表单核苷酸突变位点，红色竖线代表插入缺失位点；B：A图中所示变异位点的具体列表

A: Schematic diagram of polymorphic sites. Black vertical lines indicate the mutation sites of single nucleotide; red vertical lines indicate insertion-deletion sites. B: Detailed list of the specific variation sites shown in Fig. A

图1 *AsGolS2*的序列多态性分析

Fig. 1 Sequence polymorphism analysis of *AsGolS2*

2.3 *AsGolS2* 的生物信息学分析

通过对燕麦*AsGolS2*上游2 000 bp的启动子区进行分析，结果显示（表1），该启动子区域含有1个脱落酸响应元件、4个光响应元件和2个低温响应元件等。基因结构分析发现，燕麦*AsGolS2*包含5′-UTR、3个外显子、2个内含子和3′-UTR（附图2-A）。理化性质分析表明，该基因编码327个氨基酸，其编码蛋白由20种氨基酸组成，其中，丙氨酸的占比最高（10.7%），分子量为37.04 kD，理论等电点为5.33，脂肪指数为85.9，总平均亲水性值为-0.119，为亲水性蛋白（附图2-E），不稳定系数II为35.95，属于稳定蛋白。二级结构预测显示，该蛋白由33.03%的α-螺旋、10.70%的延伸链和56.27%的无规则卷曲构成（附图2-B）。该蛋白包含一个糖基转移酶（GT8）结构域（附图2-C），无跨膜结构（附图2-D）和信号肽（附图2-G）。磷酸化位点预测发现共有18个潜在位点，其中，丝氨酸2个，苏氨酸6个，酪氨酸10个（附图2-F）。

表1 *AsGolS2*启动子区主要顺式作用元件

Table 1 Major *cis*-acting elements in the *AsGolS2* promoter region

作用元件 Functional element	序列 Sequence	数量 Number	功能 Function
ABRE	CACGTG	1	参与脱落酸响应的顺式作用元件
AAGAA-motif	GAAAGAA	1	功能尚未明确表征
AE-box	AGAAACTT	1	光响应模块的组成部分
ARE	AAACCA	1	对厌氧诱导至关重要的顺式调控元件
CAAT-box	CCAAT	7	启动子和增强子区域中常见的顺式作用元件
G-Box	CACGTG	1	参与光响应的顺式调控元件
LTR	CCGAAA	2	参与低温响应的顺式作用元件
MBS	CAACTG	1	参与干旱诱导的MYB结合位点
MYB	CAACAG	1	MYB转录因子的结合位点
MYC	CATGTG	3	MYC转录因子的结合位点
STRE	AGGGG	2	干旱、盐碱等胁迫响应元件
TCT-motif	TCTTAC	2	光响应元件的一部分
W box	TTGACC	5	WRKY转录因子的结合位点

2.4 AsGolS2蛋白的系统进化分析

为探究燕麦AsGolS2蛋白的进化关系，从NCBI数据库中检索并筛选出8种植物的GolS2蛋白序列，包括短柄草（*Brachypodium distachyon*）、拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、小麦（*Triticum aestivum*）、大

麦（*Hordeum vulgare*）、水稻（*Oryza sativa*）、玉米（*Zea mays*）、高粱（*Sorghum bicolor*）和大豆（*Glycine max*）。利用MAGA 11软件构建系统进化树，结果显示，燕麦AsGOLS2蛋白与小麦、短柄草的GolS2蛋白聚集在同一进化分支，其中，与小麦TaGolS2蛋白的亲缘关系最近（图2）。

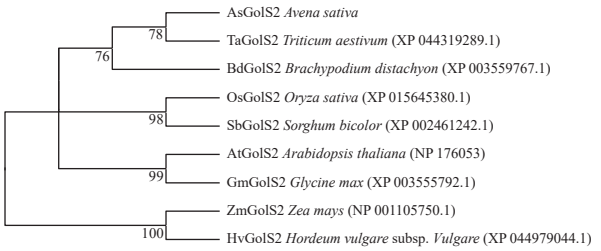
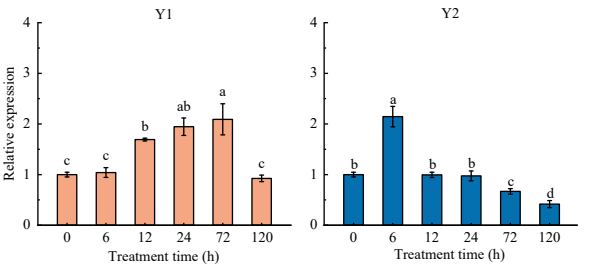


图2　AsGolS2与8种植物蛋白的系统进化树分析

Fig. 2　Phylogenetic tree analysis of AsGolS2 and eight plant proteins

2.5　盐碱胁迫处理后*AsGolS2*的表达水平分析

在不同浓度盐碱胁迫下，*AsGolS2*的表达均呈现先上升后下降的变化规律，但2种处理浓度间的时序特征存在差异。具体而言，Y1胁迫下，*AsGolS2*的表达缓慢持续上升，至72 h达到峰值，随后回落，在120 h恢复至初始水平（与0 h无显著差异）。相比之下，Y2胁迫则引起*AsGolS2*的快速强烈响应，在6 h表达量达到最高，随后迅速下降，至72 h时已显著低于0 h对照水平，并于120 h降至最低（图3）。



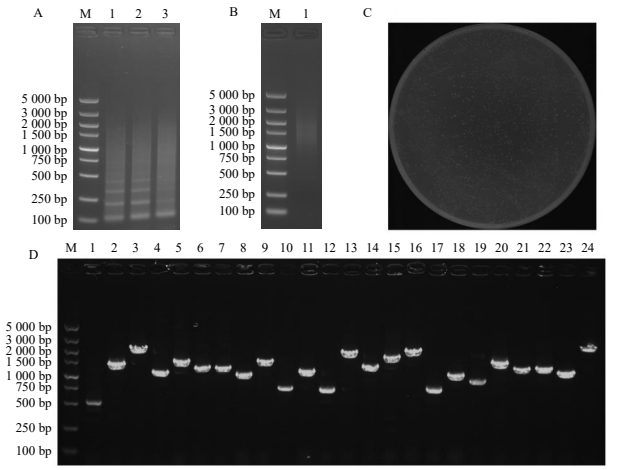
Y1：75 mmol/L. Y2：150 mmol/L. Different lowercase letters mean significant difference at the 0.05 level. The same below

图3　盐碱胁迫下*AsGolS2*基因的表达水平

Fig. 3　Expressions of *AsGolS2* gene in saline-alkali stress

2.6　酵母双杂交互作蛋白的筛选

2.6.1　燕麦酵母双杂交文库的构建　为构建酵母双杂交cDNA文库，以盐碱胁迫72 h的定莜2号叶片为材料提取总RNA，逆转录合成第一链cDNA，进而通过DNA聚合酶合成dscDNA。经琼脂糖凝胶电泳检测，dscDNA呈弥散条带，表明合成质量良好（图4-A）。随后对dscDNA进行均一化与纯化处理，以去除小于500 bp的小片段。电泳检测显示，处理后的dscDNA仍呈弥散条带，且小片段背景已基本消除，说明均一化与纯化成功（图4-B）。将纯化后的dscDNA片段与pGADT7载体连接，转化大肠杆菌。文库库容量测定为1.076×10^8 CFU/mL，总克隆数为2.152×10^8 CFU（图4-C）。随机挑选24个克隆进行菌落PCR鉴定，结果显示，所有克隆均有插入，片段平均长度大于1 000 bp（图4-D）。以上结果表明，所构建的cDNA文库库容量充足、插入片段完整，质量符合后续文库筛选实验要求。



A：dscDNA电泳图；M：Marker DL5 000，1：CK，2：Y1，3：Y2；B：均一化及去除小片段后电泳图；C：文库库容量鉴定；D：文库质量鉴定

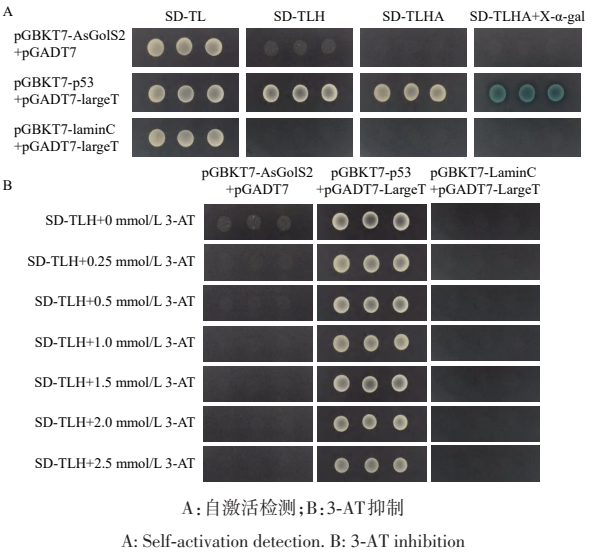
A: Electrophoresis of dscDNA. M: Marker DL5 000. 1: Control (CK); 2: Y1; 3: Y2. B: Electrophoresis after normalization and removal of short fragments. C: Determination of library titer. D: Assessment of library quality

图4　cDNA文库的构建及质量鉴定

Fig. 4　Construction and quality assessment of the cDNA library

2.6.2　诱饵载体pGBKT7-AsGolS2的构建及自激活检测　构建诱饵载体pGBKT7-AsGolS2，经测序证实目的基因序列正确，可进行后续自激活实验。阳性对照组pGBKT7-p53+pGADT7-largeT能在SD-TL、SD-TLH、SD-TLHA、SD-TLHA+X-α-gal平板上生长，并

在SD-TLHA+X-α-gal平板上显蓝色，阴性对照组pGBKT7-laminC+pGADT7-largeT在SD-TL平板上生长，在SD-TLH、SD-TLHA、SD-TLHA+X-α-gal平板上不生长，说明2组对照试验均成功（图5-A）。诱饵表达载体pGBKT7-AsGols2+pGADT7在SD-TL平板上生长，说明pGBKT7-AsGols2质粒成功转入酵母菌株中，在SD-TLHA、SD-TLHA+X-α-gal平板上不生长，在SD-TLH平板上有微弱生长，表明pGBKT7-AsGols2有微弱的自激活活性。将pGBKT7-AsGolS2+pGADT7、阳性对照pGBKT7-p53+pGADT7-LargeT、阴性对照pGBKT7-LaminC+pGADT7-LargeT在不同浓度3-AT的SD-TLH缺陷平板中培养，当3-AT浓度为0.25 mmol/L时为AsGolS2自激活最佳抑制浓度（图5-B）。



A：自激活检测；B：3-AT抑制

A: Self-activation detection. B: 3-AT inhibition

图5 诱饵载体自激活验证及3-AT浓度选择

Fig. 5 Verification of bait vector auto-activation and selection of 3-AT concentration

2.6.3 酵母双杂交筛库及回转验证 为筛选与燕麦AsGolS2蛋白互作的候选蛋白，以pGBKT7-AsGolS2诱饵质粒的AH109酵母菌株为受体，制备感受态细胞后转入燕麦cDNA文库质粒，涂布于SD-TLH+0.25 mmol/L 3-AT筛选平板进行初步筛选，共获得96个候选阳性克隆（图6-A）。提取阳性克隆质粒并测序，将所得序列与燕麦基因组数据库（PepsiCo OT3098 Hexaploid Oat v2 pseudomolecules）进行BLAST比对，去除冗余序列后最终鉴定出45个非重复候选互作蛋白。通过一对一回转验证，结果均为阳性（图6-B）。功能注释表明，这些候选互作蛋白广泛参与代谢、信号转导、蛋白质稳态等多种生物学过程（表2）。KEGG通路富集分析显示，候选互作蛋白显著富集于次生代谢物的生物合成、碳代谢、氨基酸生物合成、糖酵解及卡尔文循环等通路（图7）。

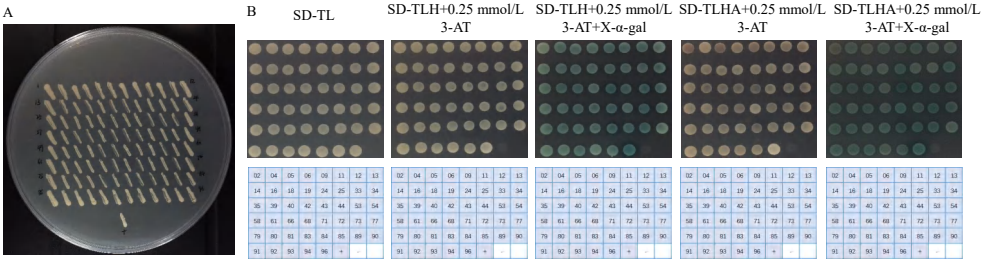


图6 酵母双杂交（A）及回转验证（B）结果

Fig. 6 Yeast two-hybrid (A) and reciprocal verification (B) results

3 讨论

*GolS*基因家族在植物响应干旱、盐碱等多种非生物胁迫中扮演着关键角色[28]。为深入探究其在燕麦耐盐碱中的功能，本研究从燕麦中成功克隆*AsGolS2*，其CDS长度为984 bp，由3个外显子构成。序列分析表明，*AsGolS2*具有参与胁迫响应的分子基础，其遗传变异主要富集于非编码UTR区，尽管这些变异在耐盐碱与盐碱敏感品种之间未呈现绝对区分的分布模式，但UTR区在基因表达调控中的关键作用已被广泛认知[29]。顺式作用元件分析表明，启动子区域中含有丰富的激素、光及环境响应元件，并存在抗逆转录因子的结合位点，为其响应复杂环

表2　AsGolS2候选互作蛋白

Table 2　Candidate interacting proteins of AsGolS2

序号 No.	基因标识符 Gene ID	蛋白名称 Protein name	分子功能 Molecular function
4	AVESA.00001b.r3.7Ag0000572	6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 6-phosphogluconate dehydrogenase	NADP结合；磷酸葡萄糖酸脱氢酶(脱羧)活性
5	AVESA.00001b.r3.1Dg0003031	糖转运蛋白MST4 Sugar transport protein MST4	跨膜转运蛋白活性
9	AVESA.00001b.r3.4Ag0001257	30S核糖体蛋白S13 30S ribosomal protein S13	核糖体结构组成；RNA结合；核酸结合
11	AVESA.00001b.r3.2Cg0002211	S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶原酶 S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme	腺苷甲硫氨酸脱羧酶活性
13	AVESA.00001b.r3.7Cg0001500	丝氨酸羧肽酶样18 Serine carboxypeptidase-like 18	丝氨酸型羧肽酶活性
14	AVESA.00001b.r3.2Dg0003272	未表征的氧化还原酶At1g06690 Uncharacterized oxidoreductase At1g06690	氧化还原酶活性
19	AVESA.00001b.r3.6Cg0000485	蛋白质高叶绿素荧光表型173 Protein HIGH CHLOROPHYLL FLUORESCENCE PHENOTYPE 173	RNA结合；光系统II组装
24	AVESA.00001b.r3.5Dg0001084	喹啉酸合成酶 Quinolinate synthase	[4Fe-4S]簇结合；喹啉酸合成酶A活性
25	AVESA.00001b.r3.5Cg0003292	伴侣蛋白dnaJ GFA2 Chaperone protein dnaJ GFA2	ATP结合；热休克蛋白结合；未折叠蛋白结合
34	AVESA.00001b.r3.3Cg0001710	SUN结构域包含蛋白2 SUN domain-containing protein 2	蛋白质-膜锚定活性
35	AVESA.00001b.r3.6Cg0002056	外膜蛋白80 Outer envelope protein 80	叶绿体组织
39	AVESA.00001b.r3.6Ag0001123	磷酸核酮糖激酶 Phosphoribulokinase	ATP结合；激酶活性；磷酸核酮糖激酶活性
40	AVESA.00001b.r3.1Ag0001739	转录因子VOZ1 Transcription factor VOZ1	序列特异性DNA结合；锌离子结合
42	AVESA.00001b.r3.7Cg0000571	过氧化物酶体(S)-2-羟基酸氧化酶GLO1 Peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase GLO1	氧化还原酶活性；FMN结合
43	AVESA.00001b.r3.5Dg0000088	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶OSK4 Serine/threonine protein kinase OSK4	ATP结合；蛋白激酶活性
44	AVESA.00001b.r3.7Dg0001328	木葡聚糖内转糖基化酶/水解酶蛋白8 Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase protein 8	水解酶活性；木葡聚糖；木糖基转移酶活性
54	AVESA.00001b.r3.7Dg0002332	可能的α-甘露糖苷酶At5g13980 Probable alpha-mannosidase At5g13980	催化活性；α-甘露糖苷酶活性；碳水化合物结合
61	AVESA.00001b.r3.3Ag0001245	S-腺苷甲硫氨酸合成酶1 S-adenosylmethionine synthase 1	ATP结合；甲硫氨酸腺苷转移酶活性
66	AVESA.00001b.r3.7Ag0001375	C末端加工肽酶3 Carboxyl-terminal-processing peptidase 3	蛋白质结合；丝氨酸型肽酶活性
68	AVESA.00001b.r3.7Cg0002489	晚胚轴富集蛋白 Protein LATE ELONGATED HYPOCOTYL	转录顺式调控区域结合
71	AVESA.00001b.r3.1Dg0002098	蛋白酶Do样1 Protease Do-like 1	丝氨酸型内肽酶活性；蛋白质结合
72	AVESA.00001b.r3.2Dg0003778	12S种子贮藏球蛋白1 12S seed storage globulin 1	营养储存物活性

表2续表 Table 2 continued

序号 No.	基因标识符 Gene ID	蛋白名称 Protein name	分子功能 Molecular function
80	AVESA.00001b.r3.6Ag0000732	甲硫氨酸氨肽酶1D Methionine aminopeptidase 1D	起始甲硫氨酰氨肽酶活性;金属离子结合;金属氨肽酶活性
84	AVESA.00001b.r3.5Cg0000202	肽基–脯氨酰顺反异构酶FKBP16-3 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP16-3	肽基–脯氨酰顺反异构酶活性
85	AVESA.00001b.r3.6Cg0002058	富马酰乙酰乙酰酶 Fumarylacetoacetase	催化活性;延胡索酰乙酰乙酸酶活性
89	AVESA.00001b.r3.6Ag0001269	伴侣蛋白dnaJ A6 Chaperone protein dnaJ A6	蛋白折叠;热休克蛋白结合;未折叠蛋白结合;Hsp70蛋白结合
90	AVESA.00001b.r3.5Dg0002096	硫醇蛋白酶aleurain Thiol protease aleurain	半胱氨酸型内肽酶活性
93	AVESA.00001b.r3.5Dg0002008	聚泛素8 Polyubiquitin 8	蛋白质结合
94	AVESA.00001b.r3.2Dg0002768	肽基–脯氨酰顺反异构酶FKBP20-2 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP20-2	肽基–脯氨酰顺反异构酶活性
96	AVESA.00001b.r3.5Ag0002377	染色质重塑蛋白EBS Chromatin remodeling protein EBS	染色质结合
6, 79, 91	AVESA.00001b.r3.1Dg0002877, AVESA.00001b.r3.4Cg0003529, AVESA.00001b.r3.4Cg0003528	烯醇化酶 Enolase	镁离子结合;磷酸丙酮酸水合酶活性
12, 16	AVESA.00001b.r3.6Ag0000268, AVESA.00001b.r3.2Dg0001159	脂氧合酶2.3 Lipoxygenase 2.3	金属离子结合;氧化还原酶活性
53, 77, 81, 92	AVESA.00001b.r3.6Dg0001185, AVESA.00001b.r3.6Ag0001496, AVESA.00001b.r3.7Dg0001656, AVESA.00001b.r3.6Cg0003509	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NAD结合;NADP结合;氧化还原酶活性
58, 83	AVESA.00001b.r3.6Ag0002227, AVESA.00001b.r3.2Cg0000580	类囊体形成蛋白1 Protein THYLAKOID FORMATION1	光系统II组装
2, 18, 33, 73	AVESA.00001b.r3.2Cg0001041, AVESA.00001b.r3.2Dg0001209, AVESA.00001b.r3.1Cg0001552, AVESA.00001b.r3.Ung0000271	未知蛋白 Unknown protein	

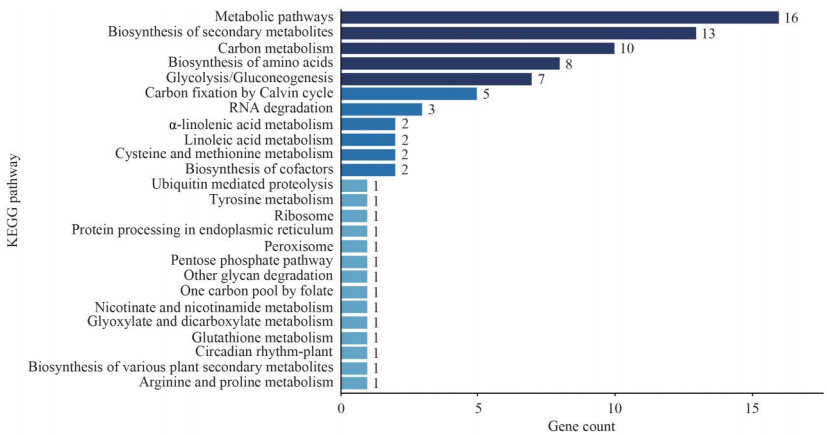


图7 AsGolS2互作蛋白KEGG通路分析

Fig. 7 KEGG pathway analysis of AsGolS2 interacting proteins

境信号提供直接的转录调控基础。系统进化分析显示，AsGolS2与小麦TaGolS2蛋白亲缘关系最近，拟南芥中的同源蛋白AtGolS2参与多种环境胁迫响应[11]，表明AsGolS2蛋白也可能在非生物胁迫中发挥重要功能。这些生物信息学特征，结合该基因在盐碱胁迫下叶片中的显著表达变化，共同揭示*AsGolS2*是燕麦响应盐碱胁迫的一个关键候选基因。

通过酵母双杂交技术筛选出45个燕麦AsGolS2相互作用的候选蛋白。KEGG通路注释分析表明，候选蛋白主要涉及多个代谢通路。其中，碳代谢是候选蛋白注释最集中的通路之一，其作为植物能量供给与渗透调节的核心环节，在胁迫适应中的关键作用已得到广泛研究[30]。上述结果表明，AsGolS2并非独立行使功能，而是通过以碳代谢为核心的多层次互作网络，协调燕麦的盐碱胁迫应答。该互作网络首先调控碳代谢与氧化还原稳态，一方面，甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH）可以与磷酸核酮糖激酶（phosphoribulokinase, PRK）互作[31]，同时，二者可在脚手架蛋白CP12的介导下形成三元复合物，其组装与解离受光照条件动态调节[32]，从而调控卡尔文循环的碳流分配。此外，GAPDH在氧化应激下可发生翻译后修饰，转而参与细胞信号调控[33]。另一方面，6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6-phosphogluconate dehydrogenase, 6PGD）是磷酸戊糖途径（pentose phosphate pathway, PPP）关键酶，可生成NADPH，为ROS的清除系统提供还原力[34]，研究表明，PGD2的磷酸化使其在细胞质中形成二聚体，暴露C末端过氧化物酶体靶向信号，从而引导其进入过氧化物酶体[35]。而（S）-2-羟基酸氧化酶（GLO1）在过氧化物酶体中参与ROS的生成[36]，二者可能通过互作网络在氧化还原稳态上形成功能关联。这不仅调控碳流，还通过整合氧化还原元件来维持细胞内氧化还原稳态，从而间接保障碳代谢的高效、稳定运行。该互作网络进一步通过关键代谢物整合胁迫信号，例如，S-腺苷甲硫氨酸合成酶（S-adenosylmethionine synthase, SAMS）催化生成的S-腺苷甲硫氨酸（S-adenosylmethionine synthase, SAM）是乙烯和多胺合成的共同前体，而这两种物质在植物胁迫响应中扮演核心角色[37]。研究表明，黄瓜CsSAMS1可与CsCDPK6互作，整合上游的钙信号与下游的多胺和乙烯代谢平衡，从而增强耐盐性[38]。该互作网络的功能稳定性还依赖于其内在的稳态维持机制，例如，DnaJ家族伴侣蛋白可通过调节Hsp70 ATP酶活性参与蛋白质折叠、组装及降解[39]；FKBP家族成员也广泛参与蛋白质折叠、植物胁迫响应等过程[40]。这些蛋白质稳态调控机制共同保障碳通量分配、胁迫信号整合等核心网络功能在逆境条件下得以可靠执行。综上，AsGolS2可能作为一个代谢调控枢纽，通过协调碳流分配、优化能量与还原力供应，并整合胁迫信号与蛋白质稳态，从而为适应盐碱胁迫提供核心的代谢基础。后续仍需通过双分子荧光互补（bimolecular fluorescence complementation, BiFC）、免疫共沉淀（co-immunoprecipitation, Co-IP）等试验进行验证，并结合遗传学与分子生物学手段，系统阐明AsGolS2及其互作网络在燕麦耐盐碱中的生物学功能与调控机制。

4　结论

从燕麦中成功克隆了*AsGolS2*，在不同品种间表现出丰富的调控区多态性，其编码蛋白不含跨膜结构。在叶片中，*AsGolS2*的表达受盐碱胁迫显著诱导。筛选到45个与AsGolS2互作的候选蛋白，涉及代谢、信号转导及蛋白质稳态等多个生物学过程，推测AsGolS2可能通过参与蛋白互作网络，协同调控多种生物学过程以增强燕麦的胁迫耐受性。

文章所有附图附表请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260420092505_NewsFile_11.pdf）。

参考文献

[1] Li PF, Mo F, Li DF, et al. Exploring agronomic strategies to improve oat productivity and control weeds: leaf type, row spacing, and planting density [J]. Can J Plant Sci, 2018, 98(5): 1084-1093.

[2] Ma X, Pan J, Ju ZL, et al. Functional characterization of *AsGRAS24* in *Avena sativa* reveals its role in enhancing salt tolerance via antioxidant and hormonal regulation in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. BMC Plant Biol, 2025, 25: 1102.

[3] Zhu GL, Liu J, Wu H, et al. The optimum mixed cropping ratio of oat and alfalfa enhanced plant growth, forage yield, and forage quality in saline soil [J]. Plants, 2024, 13(21): 3103.

[4] Han LP, Eneji AE, Steinberger Y, et al. Comparative biomass

production of six oat varieties in a saline soil ecology [J]. Commun Soil Sci Plant Anal, 2014, 45(19): 2552-2564.

[5] 王伟伟, 赵振杰, 王志, 等. 盐胁迫下与小麦生理响应相关的耐盐基因研究进展 [J]. 生物技术通报, 2025, 41(5): 14-22.
Wang WW, Zhao ZJ, Wang Z, et al. Research progress in salt-tolerant genes related to physiological response of wheat to salt stress [J]. Biotechnol Bull, 2025, 41(5): 14-22.

[6] 张海燕, 汪宝卿, 冯向阳, 等. 不同时期干旱胁迫对甘薯生长和渗透调节能力的影响 [J]. 作物学报, 2020, 46(11): 1760-1770.
Zhang HY, Wang BQ, Feng XY, et al. Effects of drought treatments at different growth stages on growth and the activity of osmotic adjustment in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] [J]. Acta Agron Sin, 2020, 46(11): 1760-1770.

[7] ElSayed AI, Rafudeen MS, Golldack D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress [J]. Plant Biol J, 2014, 16(1): 1-8.

[8] Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage [J]. Plant Physiol, 2008, 147(3): 1251-1263.

[9] Sengupta S, Mukherjee S, Basak P, et al. Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants [J]. Front Plant Sci, 2015, 6: 656.

[10] dos Santos TB, Vieira LGE. Involvement of the galactinol synthase gene in abiotic and biotic stress responses: a review on current knowledge [J]. Plant Gene, 2020, 24: 100258.

[11] Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, et al. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 2002, 29(4): 417-426.

[12] Jing QK, Chen AR, Lv ZY, et al. Systematic analysis of galactinol synthase and raffinose synthase gene families in potato and their expression patterns in development and abiotic stress responses [J]. Genes, 2023, 14(7): 1344.

[13] Shimosaka E, Ozawa K. Overexpression of cold-inducible wheat galactinol synthase confers tolerance to chilling stress in transgenic rice [J]. Breed Sci, 2015, 65(5): 363-371.

[14] Dai HB, Zhu ZH, Wang ZG, et al. *Galactinol synthase 1* improves cucumber performance under cold stress by enhancing assimilate translocation [J]. Hortic Res, 2022, 9: uhab063.

[15] Ma S, Lv JG, Li X, et al. Galactinol synthase gene 4 (*CsGolS4*) increases cold and drought tolerance in *Cucumis sativus* L. by inducing RFO accumulation and ROS scavenging [J]. Environ Exp Bot, 2021, 185: 104406.

[16] He FY, Xu JF, Jian YQ, et al. Overexpression of galactinol synthase 1 from *Solanum commersonii* (*ScGolS1*) confers freezing tolerance in transgenic potato [J]. Hortic Plant J, 2023, 9(3): 541-552.

[17] Ranjan A, Gautam S, Michael R, et al. Arsenic-induced galactinol synthase1 gene, *AtGolS1*, provides arsenic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Environ Exp Bot, 2023, 207: 105217.

[18] Wang YG, Liu HH, Wang SP, et al. Overexpression of a common wheat gene *GALACTINOL SYNTHASE3* enhances tolerance to zinc in *Arabidopsis* and rice through the modulation of reactive oxygen species production [J]. Plant Mol Biol Rep, 2016, 34(4): 794-806.

[19] Wang S, He PJ, Wang ZJ, et al. Galactinol synthase 4 influences plant height by affecting phenylpropanoid metabolism and the balance of soluble carbohydrates in tomato [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 220: 109484.

[20] Zhang HD, Zhang KP, Zhao XY, et al. Galactinol synthase 2 influences the metabolism of chlorophyll, carotenoids, and ethylene in tomato fruits [J]. J Exp Bot, 2024, 75(11): 3337-3350.

[21] Zhang HL, Sun Z, Feng S, et al. The C2H2-type zinc finger protein PhZFP1 regulates cold stress tolerance by modulating galactinol synthesis in *Petunia hybrida* [J]. J Exp Bot, 2022, 73(18): 6434-6448.

[22] Song C, Chung WS, Lim CO. Overexpression of heat shock factor gene *HsfA3* increases galactinol levels and oxidative stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. Mol Cells, 2016, 39(6): 477-483.

[23] Sonowal K, Gandass N, Kamble NU, et al. A seed-specific DNA-binding with One Finger transcription factor, RPBF, positively regulates galactinol synthase to maintain seed vigour in rice [J]. Plant Cell Physiol, 2024, 65(12): 2066-2079.

[24] Kapoor A, Mondal S, Chaudhary A, et al. A topological review on protein-protein interactions: the development and promises in the era of omics [J]. J Proteins Proteom, 2024, 15(3): 523-544.

[25] Singh A, Singhal C, Sharma AK, et al. An auxin regulated Universal stress protein (TaUSP3B-1) interacts with TaGolS and provides tolerance under drought stress and ER stress [J]. Physiol Plant, 2024, 176(3): e14390.

[26] 张碧茹. 燕麦耐盐碱种质资源鉴定及候选基因功能验证 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2024.
Zhang BR. Identification of saline-alkali tolerant oat germplasm resources and functional verification of candidate genes [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2024.

[27] Zhang BR, Mi JZ, Zhao BP, et al. Testing of saline-alkali tolerance in oat germplasm through integrated germination and field performance assessments [J]. Agronomy, 2025, 15(6): 1267.

[28] 贾雯淇, 熊玉婷, 李曼, 等. GolS在植物非生物胁迫中的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2025, 23(24): 8215-8223.
Jia WQ, Xiong YT, Li M, et al. Advances in GolS study in abiotic stress in plants [J]. Mol Plant Breed, 2025, 23(24): 8215-8223.

[29] Hardy EC, Balcerowicz M. Untranslated yet indispensable−UTRs act as key regulators in the environmental control of gene expression [J]. J Exp Bot, 2024, 75(14): 4314-4331.

[30] Xu Y, Fu XY. Reprogramming of plant central metabolism in response to abiotic stresses: a metabolomics view [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(10): 5716.

[31] 何炜, 曲梦宇, 魏毅东, 等. 水稻磷酸核酮糖激酶基因胁迫诱导表达分析与互作蛋白筛选 [J]. 农业生物技术学报, 2023, 31(1): 1-14.
He W, Qu MY, Wei YD, et al. Expression analyses of phosphoribulokinase gene induced by stresses and its interacting protein screening in rice (*Oryza sativa*) [J]. J Agric Biotechnol, 2023, 31(1): 1-14.

[32] Yu AL, Xie Y, Pan XW, et al. Photosynthetic phosphoribulokinase structures: enzymatic mechanisms and the redox regulation of the Calvin-Benson-bassham cycle [J]. Plant Cell, 2020, 32(5): 1556-1573.

[33] Tossounian MA, Zhang B, Gout I. The writers, readers, and erasers in redox regulation of GAPDH [J]. Antioxidants, 2020, 9(12): 1288.

[34] 林世锋, 付强, 余婧, 等. 烟草胞质6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶基因的克隆及表达分析 [J]. 生物技术通报, 2015, 31(5): 113-119.
Lin SF, Fu Q, Yu J, et al. Cloning and expression analysis of cytosolic 6-phosphogluconate dehydrogenase gene in tobacco (*Nicotiana tabacum*) [J]. Biotechnol Bull, 2015, 31(5): 113-119.

[35] Doering LN, Gerling N, Linnenbrügger L, et al. Evidence for dual targeting control of *Arabidopsis* 6-phosphogluconate dehydrogenase isoforms by N-terminal phosphorylation [J]. J Exp Bot, 2024, 75(10): 2848-2866.

[36] Chern M, Bai W, Chen XW, et al. Reduced expression of glycolate oxidase leads to enhanced disease resistance in rice [J]. PeerJ, 2013, 1: e28.

[37] Yin MM, Huang Z, Aslam A, et al. Genome-wide identification of *SAMS* gene family in Cucurbitaceae and the role of ClSAMS1 in watermelon tolerance to abiotic stress [J]. Plant Physiol Biochem, 2024, 211: 108708.

[38] Zhu HY, He MW, Jahan M, et al. CsCDPK6, a CsSAMS1-interacting protein, affects polyamine/ethylene biosynthesis in cucumber and enhances salt tolerance by overexpression in tobacco [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(20): 11133.

[39] 段敏杰, 李怡斐, 杨小苗, 等. 辣椒锌指蛋白*DnaJ-Like*基因家族鉴定及对高温胁迫的表达响应 [J]. 生物技术通报, 2023, 39(1): 187-198.
Duan MJ, Li YF, Yang XM, et al. Identification of zinc finger protein *DnaJ-like* gene family in *Capsicum annuum* and its expression analysis responses to high temperature stress [J]. Biotechnol Bull, 2023, 39(1): 187-198.

[40] Nie FH, Wang MH, Liu LL, et al. Genome-wide identification and bioinformatics analysis of the FK506 binding protein family in rice [J]. Genes, 2024, 15(7): 902.

（责任编辑　李楠）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):88-97

燕麦溶血磷脂酸酰基转移酶*AsLPAAT5*基因克隆与功能分析

胡荣芳[1] 丁家豪[1] 马菊花[1] 谭辉进[1] 宋亚楠[2] 薛金爱[1*]
（1.山西农业大学农学院 山西省特用作物遗传与代谢工程研究中心，太谷 030801；2.安徽财贸职业学院，合肥 230601）

摘 要： 【目的】溶血磷脂酸酰基转移酶（lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAAT）是三酰甘油（triacylglycerol, TAG）组装途径中的关键限速酶。研究燕麦*AsLPAAT5*基因在油脂合成积累中的功能，为燕麦及其他作物油脂产量与品质改良提供新思路。【方法】从燕麦中克隆*AsLPAAT5*基因（Gene ID：AVESA.00001b.r1.1Ag0003121.1），生物信息学方法分析其结构特征，通过LPAAT缺陷型大肠杆菌突变株SM2-1、酿酒酵母INVSc1和拟南芥转化体系研究AsLPAAT5酶的活性及生物学功能。【结果】燕麦*AsLPAAT5*基因编码蛋白具有LPAAT的典型保守结构域。*AsLPAAT5*基因在燕麦根、茎、叶、穗以及开花后9、17、25 d的种子中均有表达，在开花后25 d的种子中表达量最高。大肠杆菌功能互补试验证实AsLPAAT5能够恢复突变株SM2-1的细胞膜脂生物合成功能，具备LPAAT酶活性。在酿酒酵母中过表达*AsLPAAT5*导致转基因酵母总脂含量相较于野生型酵母显著升高2.11%，C16:1含量增加14.25%。在拟南芥中过表达*AsLPAAT5*使转基因拟南芥种子千粒重增加2.2%-2.8%，总油脂含量提高1.9%-2.0%，C18:2含量显著升高25.49%-26.0%。【结论】AsLPAAT5是定位于内质网且具备典型LPAAT催化活性的酶蛋白，其异源表达能够显著促进宿主总油脂积累，并对不饱和脂肪酸（尤其是C18:2）的富集具有特异性调控作用。

关键词： 燕麦；溶血磷脂酸酰基转移酶；油脂合成；亚油酸；功能分析
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0470

Cloning and Functional Characterization of the Lysophosphatidic Acid Acyltransferase Gene *AsLPAAT5* in *Avena sativa*

HU Rong-fang[1] DING Jia-hao[1] MA Ju-hua[1] TAN Hui-jin[1] SONG Ya-nan[2] XUE Jin-ai[1*]
（1. *College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Shanxi Engineering Research Center for Genetics and Metabolism of Special Crops, Taigu* 030801; 2. *Anhui Finance & Trade Vocational College, Hefei* 230601）

Abstract: 【Objective】 Lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT) is a key rate-limiting enzyme in triacylglycerol (TAG) assembly pathway. This study aimed to investigate the function of the oat (*Avena sativa* L.) *AsLPAAT5* gene in lipid biosynthesis and accumulation, providing new insights for improving oil yield and quality in oat and other crops. 【Method】 The *AsLPAAT5* gene (Gene ID: AVESA.00001b.r1.1Ag0003121.1) was cloned from oat, and its structural characteristics were analyzed using bioinformatics tools. The enzymatic activity and biological function of AsLPAAT5 were evaluated using the *Escherichia coli* LPAAT-deficient mutant strain SM2-1, *Saccharomyces cerevisiae* wild-type strain INVSc1, and *Arabidopsis thaliana* transformation systems. 【Result】 The protein encoded by *AsLPAAT5* possessed the typical conserved domains of LPAAT. *AsLPAAT5* was expressed in roots, stems, leaves, panicles, and seeds at 9, 17, and 25 days after flowering, with the highest expression level detected in seeds at 25 days after flowering. Functional complementation assays in *E. coli* confirmed that AsLPAAT5 can restore membrane lipid biosynthesis in the mutant strain SM2-1, demonstrating LPAAT enzymatic activity. Overexpression of *AsLPAAT5* in *S. cerevisiae* resulted in a significant 2.11% increase in total fatty acid content compared

收稿日期：2026-04-24
基金项目：国家自然科学基金项目（31401430），山西省基础研究计划（202103021224170），山西省高等学校科学研究优秀成果培育项目（J242042025），山西农业大学生物育种工程项目（YZGC101），山西农业大学其他纵向科研项目（2024QT043）
*通信作者：薛金爱 xuejinai@sxau.edu.cn

with wild-type yeast, along with a 14.25% increase in C16:1 content. Overexpression of *AsLPAAT5* in *A. thaliana* increased thousand-seed weight by 2.2%–2.8%, enhanced total oil content by 1.9%–2.0%, and significantly elevated C18:2 content by 25.49%–26.0%.【Conclusion】AsLPAAT5 is an endoplasmic reticulum-localized enzyme with typical LPAAT catalytic activity. Heterologous expression of *AsLPAAT5* significantly promotes total lipid accumulation in hosts and exerts a specific regulatory effect on the enrichment of unsaturated fatty acids, particularly C18:2.

Keywords: *Avena sativa* L.; lysophosphatidic acid acyltransferase; oil biosynthesis; linoleic acid; functional analysis

燕麦（*Avena sativa* L.）为禾本科燕麦属一年生草本作物，又称莜麦、铃铛麦等，是我国栽培历史悠久的传统谷类作物之一，也是全球农业体系中兼具杂粮生产、饲用价值与产业发展潜力的重要作物，对优化种植结构、保障粮食多元供给具有重要意义。燕麦籽粒的营养成分丰富且配比均衡，是功能性食品的优质原料，具有较高的经济开发价值。燕麦是唯一一种能在胚乳组织中大量积累油脂的禾谷类作物，其籽粒油脂含量远高于小麦、水稻、玉米等常见谷物[1-4]。燕麦籽粒中不饱和脂肪酸（unsaturated fatty acid, UFA）占总脂肪酸的比例超过80%，脂肪酸主要由油酸（oleic acid, OA, C18:1）和亚油酸（linoleic acid, LA, C18:2）构成，其中亚油酸占比可达38%–52%。亚油酸是人体必需脂肪酸，具有软化血管、增强血管壁弹性、预防血管硬化、延缓机体衰老等生理功能[5]。因此，解析燕麦油脂合成积累以及高亚油酸形成的分子调控机制，对提升燕麦等禾谷类作物油脂产量和品质具有重要意义。

植物油脂生物合成是一套涉及多步酶促反应、多细胞器协同运作的复杂代谢体系，脂肪酸的从头合成与三酰甘油（triacylglycerol, TAG）的组装合成是实现植物体内油脂合成与积累的两大核心代谢环节[6]。TAG是植物油脂代谢途径中的核心终产物，也是植物种子中油脂的主要储存形式。溶血磷脂酸酰基转移酶（lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAAT）是TAG组装过程中催化溶血磷脂酸（lysophosphatidic acid, LPA）*sn*-2位酰基化形成磷脂酸的关键限速酶[7-8]。LPAAT家族成员根据在细胞中的定位不同可分为质体型与内质网型两类。迄今，*LPAAT*基因已在拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）[9-10]、花生（*Arachis hypogaea*）[11]、牡丹（*Paeonia suffruticosa* Andr.）[12]、紫苏（*Perilla frutescens*）[13-14]和油菜（*Brassica campestris*）[15]等多种植物中被分离和研究。在拟南芥中鉴定到5个*LPAAT*基因，包括定位在叶绿体上的AtLPAAT1（ATS2）[16]，以及定位在内质网上的AtLPAAT2、AtLPAAT3、AtLPAAT4、AtLPAAT5[17-18]。*LPAAT*在提高植物油脂含量和促进脂肪酸合成积累中起着重要作用。例如，在拟南芥中转入油菜*BnLPAAT2*基因，转基因植株种子重量和种子总脂肪酸含量比野生植株明显增加[19]；在拟南芥中过表达蓖麻*RcLPAAT2*基因，可提高三酰甘油*sn*-2位置上油酸的含量[20]；冬菟葵*EhLPAAT2*可恢复大肠杆菌LPAAT突变体的膜脂生物合成能力，其过表达亦能促进转基因种子的油脂积累[21]；在烟草中转入油莎豆*CeLPAAT2*基因，与野生植株相比，转基因植株叶片总脂肪酸含量明显增加[22]；花生*LPAAT*基因在种子发育过程中的表达趋势与油脂积累模式同步，提示AhLPAAT参与油脂合成调控[23]；对棉花*LPAAT*家族基因的表达分析表明，*LPAAT*基因除参与种子油脂合成外，还可能通过调节脂质代谢途径为纤维细胞的快速伸长提供能量保障及膜结构组分[24]。这些研究表明LPAAT家族成员在植物油脂合成和特异脂肪酸富集过程中具有关键作用。然而，关于燕麦AsLPAAT家族成员特别是*AsLPAAT5*基因在油脂合成和积累途径中的功能及其调控机制尚不明确。

为深入阐明燕麦胚乳中油脂尤其是高价值不饱和脂肪酸的合成与积累的分子调控机制，本研究对燕麦*AsLPAAT5*基因进行克隆和生物信息学分析，利用LPAAT功能缺陷型大肠杆菌突变株SM2-1转化验证*AsLPAAT5*基因编码蛋白的酶学催化活性，通过真核模式微生物酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）INVSc1和高等模式植物拟南芥Columbia-0异源表达，系统分析AsLPAAT5在总油脂合成和不饱和脂肪酸积累中的生物学功能。研究结果将为后续利用基因工程技术定向改良油料作物的油脂含量与品质提供重要的理论依据与基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所用的燕麦试验材料为CEav5651品种，其种子由山西农业大学分子农业与生物能源研究所保存。分别取两叶一心期的根、茎、叶片，抽穗期的穗，以及不同发育时期的种子（开花后9、17、25 d），液氮速冻后存于-80 ℃备用。野生型（wild type, WT）拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）为Columbia-0，放置于人工气候培养箱培养，生长条件设置为光暗周期16 h光照/8 h黑暗，光照强度90 μmol/m^2/s，温度22 ℃，相对湿度60%。LPAAT缺失大肠杆菌突变株SM2-1、大肠杆菌DH5α、根癌农杆菌GV3101、酿酒酵母野生型菌株INVSc1，大肠杆菌表达载体pET28A、酵母表达载体pYES2.0、组成型植物过表达载体pCAMBIA1302以及GFP融合植物表达载体pCAMBIA1300均保存于山西农业大学分子农业与生物能源研究所。

1.2 方法

1.2.1 燕麦AsLPAAT5蛋白的鉴定及基本理化性质分析 利用TAIR数据库（http://www.arabidopsis.org/）下载拟南芥AtLPAAT的蛋白序列（拟南芥AtLPAAT1-5的TAIR登录号分别为：At4g30580、At3g57650、At1g51260、At1g75020、At3g18850）作为查询序列，在燕麦基因组数据库（https://wheat.pw.usda.gov/GG3/graingenes-downloads/pepsico-oat-oc3098-v2-files-2021）中进行Blast比对分析，设置初始阈值E-value≤1e^{-10}。通过NCBI-CDD（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）对Blast鉴定到的所有序列的功能结构域进行预测分析，手动剔除结构域不完整的序列，最终获得12个具有典型LPLAT结构域的燕麦AsLPAAT家族成员。结合课题组内部转录组表达谱数据（未发表），选择在燕麦发育种子中高表达的AsLPAAT5成员（基因ID：AVESA.00001b.r1.1Ag0003121.1）作为目的序列进行后续研究。借助MEGA11软件对燕麦AsLPAAT5和其他物种LPAAT蛋白序列构建系统发育进化树。同时，通过ExPASy-ProParam在线工具（http://web.expasy.org/protparam/）系统分析AsLPAAT5蛋白的理化特性。

1.2.2 燕麦*AsLPAAT5*基因表达谱分析 提取燕麦根、茎、叶、穗和不同发育时期种子样本的总RNA，反转录合成第一链cDNA。用Primer6.0设计特异性引物（表1），并通过Blast比对确认所有引物的扩增特异性。以*AsEP*为内参基因[25]，使用2×RealStar Green Power Mixture试剂盒（GenStar公司）进行RT-qPCR扩增，反应程序为95 ℃ 2 min；95 ℃ 15 s，60 ℃ 30 s；40次循环。分析*AsLPAAT5*基因在燕麦

表1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence(5′-3′)	用途 Purpose
1302-*AsLPAAT5*-F	acgggggactcttgaccatggATGTGGTTAGCCATGTTTCCATT	载体构建
1302-*AsLPAAT5*-R	aagttcttctcctttactagtTCAGAGTTTCTTGGCATGTGCG	
pYES2.0-*AsLPAAT5*-F	gggaatattaagcttggtaccATGTGGTTAGCCATGTTTCCATT	载体构建
pYES2.0-*AsLPAAT5*-R	tacatgatgcggccctctagaTCAGAGTTTCTTGGCATGTGCG	
1300-*AsLPAAT5*-F	gcccttgctcaccatggtaccATGTGGTTAGCCATGTTTCCATT	载体构建
1300-*AsLPAAT5*-R	atacaccaaatcgactctagaGAGTTTCTTGGCATGTGCGC	
pET28A-*AsLPAAT5*-F	gcaagcttgtcgacggagctcATGTGGTTAGCCATGTTTCCATT	载体构建
pET28A-*AsLPAAT5*-R	ggataacaattcccctctagaTCAGAGTTTCTTGGCATGTGCG	
AsLPAAT5-qRT-F	ATACAAGCATCGGCTGCCAACT	qPCR
AsLPAAT5-qRT-R	CCTGAACCACACGGACGAGAAC	
AsEP-F	GCACAAGTGATGCCAGAATAGC	内参基因
AsEP-R	CGAGATGCATTAGATTCGTTGG	

注：小写字母表示载体骨架上的同源臂序列或者同源重组接头序列

Note: Lowercase letters indicate homology arm sequences or homologous recombination linker sequences on the vector backbone

不同组织及种子不同发育时期的表达水平。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算*AsLPAAT5*基因的相对表达量。

1.2.3　AsLPAAT5蛋白在大肠杆菌突变株SM2-1中的功能互补测试　采用同源重组法构建表达载体：根据*AsLPAAT5*基因CDS序列设计携带*Xba* I和*Sac* I酶切位点的同源臂引物（表1），以燕麦cDNA为模板，使用*Xba* I和*Sac* I限制性内切酶对pET28A载体进行线性化，将*AsLPAAT5*片段连接至pET28A载体后转化大肠杆菌DH5α感受态，经菌液PCR和测序鉴定获得pET28A-*AsLPAAT5*重组质粒。将其与空载体pET28A分别转化大肠杆菌SM2-1感受态细胞，在含50 μg/mL卡那霉素的LB平板上筛选阳性克隆，并经菌液PCR验证。将验证为阳性的pET28A-*AsLPAAT5*及pET28A转化菌株于液体培养基中30 ℃过夜培养，调整OD_{600}至0.1，对菌液进行稀释并划线到两个添加0.1 mmol/L异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG）的选择性琼脂培养基上，分别置于30 ℃和42 ℃培养，观察菌落生长差异并拍照。

1.2.4　燕麦AsLPAAT5蛋白亚细胞定位分析　采用同源重组法构建表达载体，将目标基因片段*AsLPAAT5*连接至pCAMBIA1300植物表达载体中，并转化大肠杆菌DH5α感受态，经菌液PCR和测序鉴定获得pCAMBIA1300-*AsLPAAT5*重组质粒。通过农杆菌介导法将构建好的GFP融合植物表达载体pCAMBIA1300-*AsLPAAT5*、pCAMBIA1300空载体分别和内质网定位标记载体pCAMBIA1300-35S-ER-mCherry-HDEL（ER-mCherry）注射侵染本氏烟草叶片（6周龄左右），黑暗条件下培养2 d后使用激光共聚焦显微镜（LEICA TCS SP8，德国）观察GFP荧光信号的亚细胞定位并拍照。

1.2.5　*AsLPAAT5*基因在酵母中的过表达及功能分析　将*AsLPAAT5*连接至酵母表达载体pYES2.0（经*Xba* I和*Kpn* I内切酶线性化）并转化DH5α感受态，经测序验证后获得重组质粒pYES2.0-*AsLPAAT5*。采用醋酸锂法将重组质粒及空载体分别转化酿酒酵母INVSc1，于SC-URA平板30 ℃培养2–4 d，经PCR鉴定阳性菌株后，接种于SC-URA液体培养基培养2–3 d，离心收集菌体。取一部分菌体沉淀重悬至OD_{600}≈0.2，与等体积BODIPY染液混合，37 ℃避光孵育10–15 min，激光共聚焦显微镜下观察酵母细胞中油滴染色情况。剩余菌体经冷冻干燥研磨后用于脂肪酸分析[26–27]。

1.2.6　*AsLPAAT5*植物表达载体构建及在拟南芥中的遗传转化　采用同源重组法构建植物表达载体pCAMBIA1302-*AsLPAAT5*，鉴定阳性克隆后提取质粒并进一步转入农杆菌GV3101细胞，通过花序侵染法转化拟南芥。转基因种子经潮霉素筛选后，挑选生长健壮、根系发达的幼苗移栽至营养土。取转基因植株叶片，通过CTAB法提取DNA并经PCR鉴定阳性株系。连续筛选至T_3代，获得稳定遗传的纯合系。收集T_3代纯合株系种子，真空冷冻干燥后研磨成粉末，用于后续指标测定。

1.2.7　总脂肪酸提取及含量测定　将冻干样品研磨成粉末，准确称取50 mg样品加入置于50 mL离心管中，加入7.5 mL甲醇–氯仿（2∶1，v/v）混合提取液，置于37 ℃摇床中，200 r/min振荡提取24 h。离心后收集上清液，向剩余沉淀中加入7.5 mL混合提取液，抽提12 h，合并两次上清液，向其中加入5 mL氯仿和9 mL 1% NaCl溶液，使体系中氯仿∶甲醇∶水相体积比达到2.0∶2.0∶1.8。充分混匀后离心，小心吸取下层有机相并转移至预先称重的玻璃管中（m_0），挥干溶剂后再次称重（m_1）。总脂肪酸含量计算公式如下。

$$总脂肪酸含量（\%）=[(m_1-m_0)/0.05]\times100\%$$

1.2.8　脂肪酸甲酯的制备及各组分含量测定　准确称取50 mg转基因酵母或拟南芥种子冻干样品置于玻璃管中，加入50 μL十七烷酸甘油三酯作为内标。随后加入1 mL氯仿–甲醇（2∶1，v/v）混合液，涡旋混匀后，依次加入500 μL 0.9% KCl溶液与1 mL氯仿，混匀后4 000 r/min离心10 min，小心吸取下层氯仿相至新玻璃管，60 ℃烘干。向烘干样品中加入500 μL含2.5%浓硫酸的甲醇溶液，混匀后于80 ℃水浴2 h。反应结束后加入500 μL正己烷与1 mL 0.9% KCl溶液，涡旋混匀，4 000 r/min离心10 min，收集上清液于新玻璃管，60 ℃挥干溶剂。最后加入500 μL正己烷复溶，转移至气相色谱进样小瓶待测。

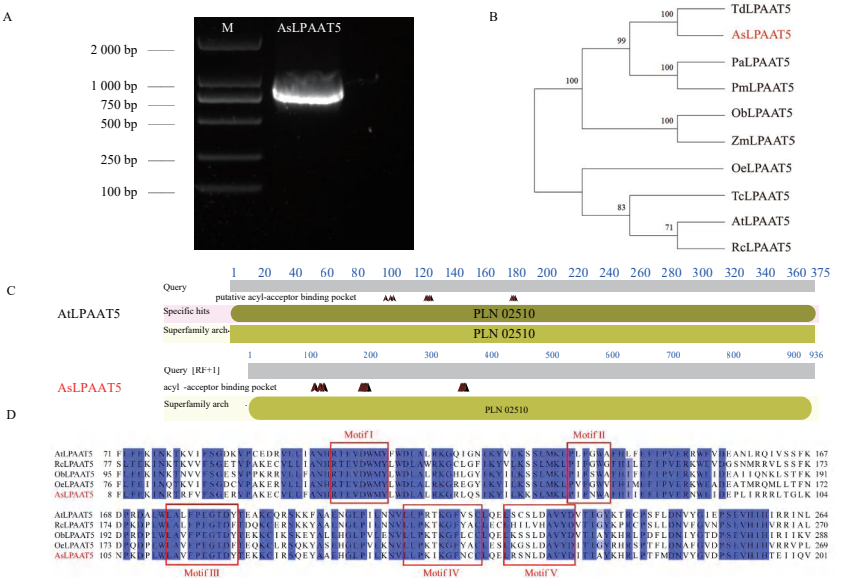
1.2.9　数据统计分析　每个试验均进行3次生物学重复。使用SPSS 27.0软件对数据进行单因素方差分析，并采用邓肯检验进行事后多重比较以判断差异

显著性（$P<0.05$）。

2 结果

2.1 *AsLPAAT5*基因的克隆与生物信息学分析

以燕麦种子的cDNA为模板，用高保真酶通过RT-PCR技术对*AsLPAAT5*基因进行扩增。将扩增产物纯化回收后进行测序验证，获得一长度为936 bp的核酸片段，其序列与燕麦基因组中*AsLPAAT5*基因（Gene ID：AVESA.00001b.r1.1Ag0003121.1）CDS区域完全一致，表明*AsLPAAT5*基因克隆成功（图1-A）。理化性质分析表明，*AsLPAAT5*基因编码氨基酸数为311，AsLPAAT5蛋白的不稳定性系数和亲水性指数分别为41.72和0.75，预测其为不稳定性疏水蛋白。利用MEGA11软件对燕麦AsLPAAT5蛋白和野生二粒小麦（*Triticum dicoccum*）、芦苇（*Phragmites australis*）、稷（*Panicum miliaceum*）、短花稻（*Oryza brachyantha*）、玉米（*Zea mays*）、油橄榄（*Olea europaea*）、可可树（*Theobroma cacao*）、拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、蓖麻（*Ricinus communis*）LPAAT蛋白构建进化树（图1-B），结果显示，燕麦AsLPAAT5蛋白与野生二粒小麦TdLPAAT5在进化上亲缘关系较近。功能结构域预测分析表明AsLPAAT5蛋白具有溶血磷脂酸酰基转移酶功能结构域，属于溶血磷脂酰基转移酶（LPLAT）蛋白超家族成员。LPAATs蛋白氨基酸多序列比对分析发现（图1-C、D），燕麦和其他物种LPAAT5均具有LPAAT蛋白的保守基序：NHRSDID（motif Ⅰ）、LPVIGW（motif Ⅱ）、WLALFVEGTR（motif Ⅲ）、NVLIPRIKGFV（motif Ⅳ）和MRSFVPAIYD(X)TV（motif Ⅴ），说明LPAAT5蛋白在进化过程中保守性较高。



A：燕麦*AsLPAAT5*基因的克隆，M：DNA marker DL 2000；B：不同物种LPAATs蛋白系统进化树；C：AsLPAAT5蛋白结构域；D：LPAAT5蛋白保守氨基酸序列

A: Cloning of *AsLPAAT5*, M: DNA marker DL 2000. B: Phylogenetic tree of LPAAT proteins from different plant species. C: Protein domain of AsLPAAT5. D: Conserved amino acid sequences of LPAAT5 proteins

图1 *AsLPAAT5*基因克隆及其序列特征分析

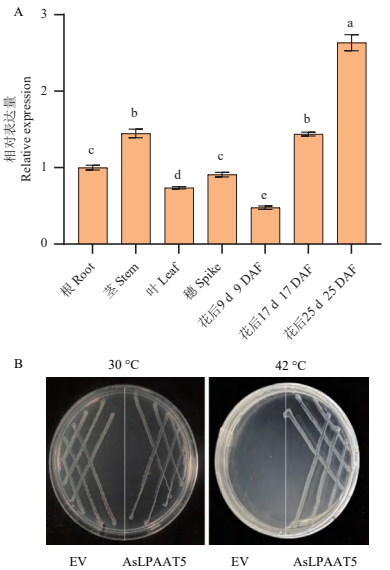
Fig. 1 Cloning and sequence characterization of *AsLPAAT5* gene

2.2 燕麦*AsLPAAT5*基因在发育种子中高表达且具有LPAAT酶活性

对*AsLPAAT5*基因在燕麦不同组织及不同发育阶段种子中的表达水平进行定量分析（图2-A）。结果表明，*AsLPAAT5*在燕麦所有检测组织中均有表达，具有组成型表达的特点。其中，在种子发育进程中，*AsLPAAT5*表达量呈逐渐上升趋势，于开花后25 d达到峰值，约为发育前期种子（开花后9 d）中表达量

的5.53倍。

大肠杆菌LPAAT突变株SM2-1不能合成组成细胞膜的甘油酯，是温度敏感型菌株，在30–37 ℃条件下培养可以正常生长，而在42 ℃下死亡，已广泛用于验证植物LPAAT酶蛋白的功能。将载有过表达载体pET28A-*AsLPAAT5*和pET28A（空载）的SM2-1菌株于30 ℃过夜培养，调整OD_{600}约为0.1。将由初始浓度菌液制成的稀释液在两个含IPTG的选择性培养基上划线，分别置于30 ℃和42 ℃培养。温度敏感性测试结果显示（图2-B），30 ℃条件下，转空载体pET28A与转AsLPAAT5的SM2-1菌株均能正常生长；但在42 ℃下，仅AsLPAAT5转化菌株存活，空载体对照菌株死亡。这表明AsLPAAT5成功互补了SM2-1突变株的LPAAT功能，可催化大肠杆菌中膜脂的生物合成。



A：*AsLPAAT5*基因表达分析；B：AsLPAAT5在SM2-1菌株中的功能互补测试。不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$），下同

A: Expression analysis of *AsLPAAT5*. B: Functional complementation test of AsLPAAT5 in the SM2-1 strain. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$). The same below

图2　AsLPAAT5蛋白酶活验证

Fig. 2　Enzyme activity validation of AsLPAAT5 protein

2.3　AsLPAAT5蛋白亚细胞定位

将构建好的35S:AsLPAAT5:GFP载体和pCAMBIA1300空载转入GV3101并注射侵染本氏烟草叶片，暗培养2 d后撕取烟草表皮细胞，在激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光蛋白的分布（图3）。结果显示AsLPAAT5/GFP重组质粒携带绿色荧光与内质网定位marker质粒ER-mCherry携带红色荧光重合，说明AsLPAAT5酶蛋白主要与内质网相关。

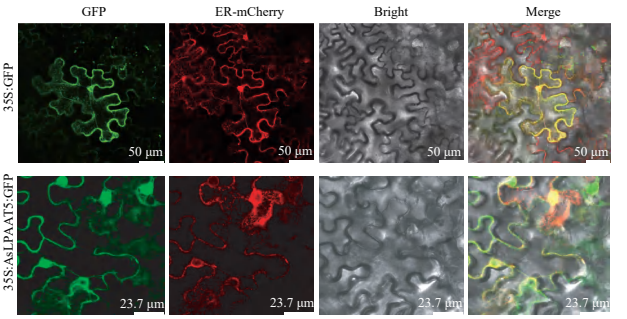


图3　AsLPAAT5蛋白的亚细胞定位

Fig. 3　Subcellular localization of AsLPAAT5 protein

2.4　燕麦*AsLPAAT5*异源表达促进转基因酵母脂质合成

为研究*AsLPAAT5*基因在油脂合成过程中发挥的具体作用，本研究将酵母重组表达载体pYES2.0-*AsLPAAT5*转入野生型酿酒酵母INVSc1，同时将空载体pYES2.0转化作为对照，诱导培养后对各酵母菌株进行BODIPY染色，通过共聚焦显微镜观察酵母细胞中的油滴分布，对转基因酵母脂质合成进行定性分析。结果表明（图4），与转pYES2.0空载体的对照酵母相比，过表达*AsLPAAT5*的酵母细胞中油滴染色信号明显增强，提示转基因酵母细胞内中性脂积累水平上升。

随后，分别对各组酵母的总脂肪酸含量和脂肪酸组分进行定量分析。结果发现（图5-A），转入空载体pYES2.0的酵母，其总脂肪酸含量和野生型酵母相比未出现明显变化，说明空载体的导入不会对酿酒酵母的油脂合成造成显著影响。而转入pYES2.0-*AsLPAAT5*重组载体的酵母，其总脂肪酸含量相较于野生型对照酵母提升了2.11%，这一结果证明*AsLPAAT5*基因过表达可介导酿酒酵母的脂肪酸代谢过程，并且能有效提升酿酒酵母细胞内的油脂积累量。脂肪酸组分检测结果显示（图5-B），野生型酵母INVSc1、转入空载体pYES2.0的酵母与转入

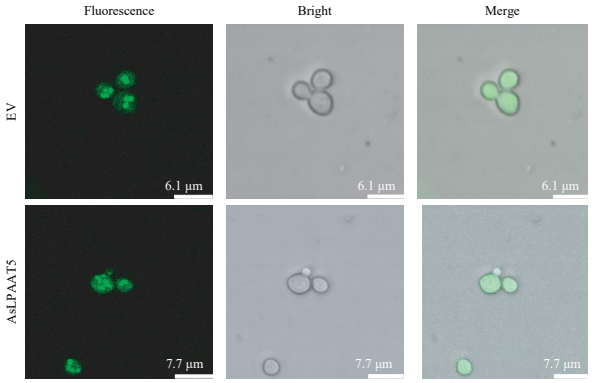
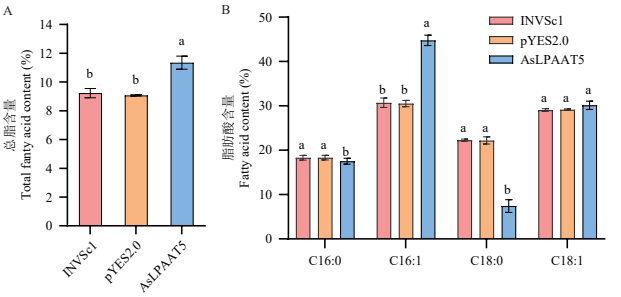


图4 转基因酵母油滴BODIPY染色

Fig. 4 Oil-bodies staining of transgenic yeast



A:*AsLPAAT5*转基因酵母总脂含量;B:*AsLPAAT5*转基因酵母脂肪酸含量

A: Total fatty acid content of *AsLPAAT5* transgenic yeast. B: Fatty acid content of *AsLPAAT5* transgenic yeast

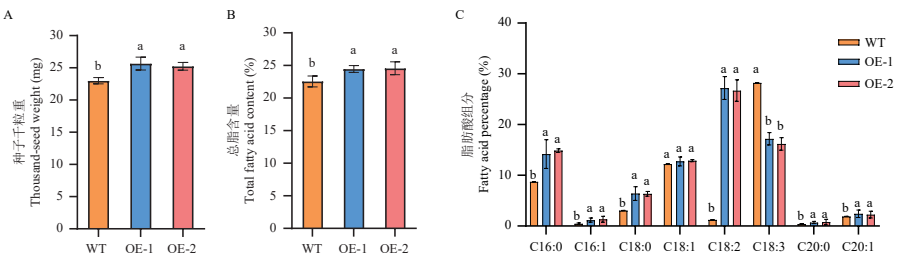
图5 *AsLPAAT5*转基因酵母油脂含量分析

Fig. 5 Analysis of lipid content in *AsLPAAT5* transgenic yeast

*AsLPAAT5*基因的酵母脂肪酸组分种类一致。对各组分含量进行对比后发现，与转空载体pYES2.0的对照酵母相比，转*AsLPAAT5*基因的酵母菌株中，C16:1（棕榈油酸）的含量显著提高了14.25%，同时C18:1（油酸）含量也有小幅提升（1.1%），C16:0（棕榈酸）与C18:0（硬脂酸）含量分别下降了0.8%和14.78%。这一结果表明，*AsLPAAT5*基因在酿酒酵母中异源表达能够显著改变酵母细胞内脂肪酸组分的占比。检测数据进一步显示，该基因能够有效促进不饱和脂肪酸的合成，其中对C16:1的积累表现出显著的上调作用。

2.5 燕麦*AsLPAAT5*过表达提高拟南芥油脂合成与积累

为了研究*AsLPAAT5*在其他作物油脂合成积累中发挥的生物学功能，将其在拟南芥中异源过表达，筛选获得阳性转基因拟南芥后进行表型测定。结果表明，*AsLPAAT5*过表达拟南芥的种子千粒重明显高于野生型拟南芥，转基因种子较野生型种子千粒重增加了2.2%–2.8%（图6-A）。提取转基因拟南芥和野生型拟南芥种子的油脂并对其含量进行分析，与野生型相比，转基因拟南芥种子含油量提高了1.9%–2.0%（图6-B）。对拟南芥种子进行脂肪酸组分的测定，结果表明，与野生型拟南芥相比，转基因拟南芥种子中C16:0含量上升了5.47%–6.15%，C16:1含量上升了0.71%–0.8%，C18:0含量上升了3.31%–3.36%，C18:1略微上升了0.54%–0.68%，C18:2显著升高了25.49%–26%，C18:3含量显著下降了11%–12.02%，C20:0含量上升了0.3%–0.38%，C20:1含量上升了0.34%–0.51%（图6-C）。总之，*AsLPAAT5*基因的异源表达提高了拟南芥种子总油脂的合成并改变了脂肪酸组分的含量。



A:拟南芥种子千粒重;B:总脂含量;C:脂肪酸组分

A: Thousand-seed weight of *A. thaliana*. B: Total fatty acid content. C: Fatty acid composition

图6 转基因拟南芥表型及油脂分析

Fig. 6 Phenotypic and lipid analysis of transgenic *Arabidopsis*

3　讨论

燕麦是禾本科中唯一能在胚乳组织中大量积累油脂的作物，其籽粒油脂含量显著高于小麦、水稻及玉米等谷物，且不饱和脂肪酸占总脂肪酸的比例超过80%[5]，具有重要的营养健康价值。然而，目前关于燕麦种子油脂合成及不饱和脂肪酸富集的分子调控机制仍缺乏系统研究。LPAAT是催化TAG组装过程中LPA的*sn*-2位酰基化形成PA的关键限速酶，在植物油脂合成中发挥重要作用[7-8]，但其在燕麦油脂代谢中的具体功能尚不明确。

本研究从燕麦中成功克隆得到*AsLPAAT5*基因（AVESA.00001b.r1.1Ag0003121.1，位于A亚基因组1号染色体），其CDS全长为936 bp，编码311个氨基酸。AsLPAAT5蛋白属于LPLAT超家族，包含LPAAT典型的5个保守基序（motif I–V），表明其在进化过程中高度保守。系统进化树分析进一步揭示，AsLPAAT5与野生二粒小麦TdLPAAT5亲缘关系最近，符合禾本科物种间的演化关系。蛋白理化性质预测其为不稳定性疏水蛋白，这与LPAAT作为膜结合酶的特性相符[28]。亚细胞定位结果显示，AsLPAAT5蛋白与内质网定位相关，这与多数真核生物内质网型LPAAT的定位特征一致[17-18, 29-30]。但关于AsLPAAT5蛋白的精细亚细胞定位今后仍需采用其他内质网标记物或生化方法进一步验证。表达模式分析表明，*AsLPAAT5*在燕麦各组织中均表达，但在发育后期的种子（开花后25 d）中表达量最高，约为开花后9 d的5.53倍。这一时空表达特征暗示该基因可能在种子油脂快速积累阶段发挥关键作用，与多种植物中*LPAAT*基因在种子发育后期高表达的研究结果相似[11-12, 31]。大肠杆菌温度敏感突变株SM2-1菌株因缺失LPAAT功能在非允许温度（42 ℃）下无法合成细胞膜脂而死亡[21]，但转化外源LPAAT酶基因的菌株能够恢复正常生长，因此常被用于验证LPAAT酶的甘油酯合成活性。如紫苏*PfLPAT1B*[14]、冬菟葵*EhLPAAT2*[21]等在SM2-1菌株中的过表达均证实了LPAAT的酶活特性。本研究中大肠杆菌SM2-1菌株互补功能测试结果显示，转入*AsLPAAT5*的SM2-1菌株在42 ℃下可正常生长，而空载体对照无法存活，结果证明AsLPAAT5蛋白具有典型的LPAAT催化活性，能够恢复大肠杆菌膜脂的生物合成。

研究表明，LPAAT对酰基底物的选择性在不同物种间具有差异，如杯状花（*Cuphea*）LPAAT对中链饱和脂肪酸有较高选择性[32]，而三角褐指藻（*Phaeodactylum tricornutum*）LPAAT则影响酵母中多种脂肪酸的组成[33]。为进一步探究AsLPAAT5的生物学功能，本研究构建了酿酒酵母异源过表达体系。结果表明，在酵母中过表达*AsLPAAT5*导致总脂肪酸含量显著提升2.11%，表明该基因能有效促进宿主油脂积累。脂肪酸组分分析显示，转*AsLPAAT5*基因酵母中C16:1相对含量显著提高14.25%，而C16:0和C18:0等饱和脂肪酸含量下降，表明AsLPAAT5在异源宿主酵母中对C16:1具有较高的底物偏好性。同时，在拟南芥中过表达*AsLPAAT5*进一步验证了其促进油脂合成及调控脂肪酸组分的能力。转基因拟南芥种子的总脂肪酸含量与野生型相比显著提高了1.9%–2.0%，千粒重增加了2.2%–2.8%，表明该基因能够有效提升种子油脂产量与粒重，这与在拟南芥中过表达油菜*BnLPAAT2*[15, 19]及蓖麻*RcLPAAT2*[20]的研究结果一致。值得注意的是，转基因拟南芥种子中C18:2含量显著升高25.49%–26.0%，而C18:3含量下降。这一变化可能与AsLPAAT5对特定酰基供体的选择性有关，其优先催化将C18:2-CoA引入LPA的*sn*-2位，从而改变了种子中不饱和脂肪酸的最终分配。此外，LPAAT的转录调控也是影响其功能的重要层面。例如，在油棕等作物中还发现*LPAAT*基因受上游转录因子如EgMADS3的调控，参与油棕长链脂肪酸的合成代谢[34]。在烟草中过表达*LPAAT*基因或WRI1转录因子均提高种子油脂含量[35]，但二者共表达时未观察到协同增效作用，表明植物油脂生物合成可能受底物供给水平和与其他基因互作关系的协同调控。

本研究通过大肠杆菌、酿酒酵母及拟南芥异源表达体系证实了AsLPAAT5具有LPAAT酶活性，并能促进油脂积累及调控脂肪酸组成，但仍存在一定局限性。首先，缺乏燕麦内源的遗传操作（基因敲除、沉默或过表达）证据，因此AsLPAAT5在燕麦胚乳油脂合成中的原位功能有待验证。其次，AsLPAAT5在油脂合成网络中的调控层级尚不清晰，其

与上游底物供给、下游TAG组装关键酶（如DGAT、PDAT）的协同关系亦有待阐明。此外，AsLPAAT5酶在酿酒酵母中偏好C16:1，在拟南芥中偏好C18:2，这一差异可能主要归因于宿主酰基-CoA底物库的不同，即酿酒酵母天然缺失C18:2和C18:3合成途径，导致观察到的底物利用表型差异可能反映的是宿主背景效应，而非酶本身内在底物选择性的改变。然而，内质网膜微环境对酶活性的潜在影响尚不能完全排除。未来研究需在可控底物条件下（如外源脂肪酸饲喂试验或体外酶活测定）进一步明确AsLPAAT5的底物选择性，并通过建立燕麦稳定遗传转化体系，结合多组学与代谢流技术，系统解析其在燕麦油脂代谢网络中的功能与调控机制。

4 结论

*AsLPAAT5*基因在燕麦发育的种子中高表达。在酿酒酵母INVSc1中过表达*AsLPAAT5*基因显著提升了酵母宿主的总脂肪酸和C16:1的积累量；在拟南芥中异源过表达*AsLPAAT5*能够显著提高转基因拟南芥种子的总脂肪酸含量，同时特异性促进C18:2不饱和脂肪酸的富集。

参考文献

[1] Banaś A, Debski H, Banaś W, et al. Lipids in grain tissues of oat (*Avena sativa*): differences in content, time of deposition, and fatty acid composition [J]. J Exp Bot, 2007, 58(10): 2463-2470.

[2] Snell P, Wilkinson M, Taylor GJ, et al. Characterisation of grains and flour fractions from field grown transgenic oil-accumulating wheat expressing oat WRI1 [J]. Plants, 2022, 11(7): 889.

[3] Heneen WK, Banaś A, Leonova S, et al. The distribution of oil in the oat grain [J]. Plant Signal Behav, 2009, 4(1): 55-56.

[4] Grimberg Å, Wilkinson M, Snell P, et al. Transitions in wheat endosperm metabolism upon transcriptional induction of oil accumulation by oat endosperm WRINKLED1 [J]. BMC Plant Biol, 2020, 20: 235.

[5] 陈磊. 燕麦的营养功能及综合加工利用 [J]. 食品与机械, 2012, 28(2): 236-237.
Chen L. Nutritional functions and process utilizations of oat [J]. Food Mach, 2012, 28(2): 236-237.

[6] 王龙龙. 花生二酰甘油酰基转移酶(*DGAT*)基因的克隆与分析 [D]. 济南: 山东师范大学, 2010.
Wang LL. Cloning and characterization of diacylglycerol acyltransferase (*DGAT*) gene in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [D]. Jinan: Shandong Normal University, 2010.

[7] 张美莹, 莫倩, 齐秀双, 等. 牡丹*PoLPAT2*基因的克隆及表达分析 [J]. 浙江农业学报, 2025, 37(2): 321-328.
Zhang MY, Mo Q, Qi XS, et al. Cloning and expression analysis of peony *PoLPAT2* gene [J]. Acta Agric Zhejiangensis, 2025, 37(2): 321-328.

[8] 吉白璐, 孙艺文, 刘万峰, 等. 烟草脂类合成关键基因*NtLPAT*的功能验证 [J]. 作物学报, 2025, 51(9): 2527-2537.
Ji BL, Sun YW, Liu WF, et al. Functional verification of the key gene *NtLPAT* involved in lipid biosynthesis in tobacco [J]. Acta Agron Sin, 2025, 51(9): 2527-2537.

[9] Yu B, Wakao S, Fan JL, et al. Loss of plastidic lysophosphatidic acid acyltransferase causes embryo-lethality in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Physiol, 2004, 45(5): 503-510.

[10] Barroga NAM, Nguyen VC, Nakamura Y. The role of lysophosphatidic acid acyltransferase 1 in reproductive growth of *Arabidopsis thaliana* [J]. J Exp Bot, 2024, 75(22): 7190-7201.

[11] 董芳, 迟晓元, 杨庆利, 等. 三个花生溶血磷脂酸酰基转移酶基因的克隆与序列分析 [J]. 花生学报, 2013(1): 1-11.
Dong F, Chi XY, Yang QL, et al. Cloning and sequence analysis of three lysophosphatidic acid acyltransferase (*LPAT*) encoding genes in peanut [J]. J Peanut Sci, 2013(1): 1-11.

[12] Zhang QY, Yu R, Sun DY, et al. PrLPAAT4, a putative lysophosphatidic acid acyltransferase from *Paeonia rockii*, plays an important role in seed fatty acid biosynthesis [J]. Molecules, 2017, 22(10): 1694.

[13] 周雅莉, 黄旭升, 郝月茹, 等. 紫苏溶血磷脂酸酰基转移酶基因的克隆与功能分析 [J]. 生物工程学报, 2022, 38(8): 3014-3028.
Zhou YL, Huang XS, Hao YR, et al. Cloning and functional characterization of a lysophosphatidic acid acyltransferase gene from *Perilla frutescens* [J]. Chin J Biotechnol, 2022, 38(8): 3014-3028.

[14] 黄旭升, 周雅莉, 柴旭东, 等. 紫苏质体型*PfLPAT1B*基因的克隆及其在油脂合成中的功能分析 [J]. 生物技术通报, 2025, 41(7): 226-236.
Huang XS, Zhou YL, Chai XD, et al. Cloning of plastidial *PfLPAT1B* gene from *Perilla frutescens* and its functional analysis in oil biosynthesis [J]. Biotechnol Bull, 2025, 41(7): 226-236.

[15] Zhang K, He JJ, Yin YT, et al. Lysophosphatidic acid acyltransferase 2 and 5 commonly, but differently, promote seed oil accumulation in *Brassica napus* [J]. Biotechnol Biofuels, 2022, 15: 83.

[16] Maisonneuve S, Guyot R, Delseny M, et al. A multigene family of lysophosphatidic acid acyltransferases of *Arabidopsis thaliana* [M]// Advanced Research on Plant Lipids. DordrechtSpringer Netherlands2003: 183-186.

[17] Wattelet-Boyer V, Le Guédard M, Dittrich-Domergue F, et al. Lysophosphatidic acid acyltransferases: a link with intracellular

protein trafficking in *Arabidopsis* root cells? [J]. J Exp Bot, 2022, 73(5): 1327-1343.

[18] Angkawijaya AE, Nguyen VC, Nakamura Y. LYSOPHOSPHATIDIC ACID ACYLTRANSFERASES 4 and 5 are involved in glycerolipid metabolism and nitrogen starvation response in *Arabidopsis* [J]. New Phytol, 2019, 224(1): 336-351.

[19] 尹永泰. 甘蓝型油菜溶血磷脂酰基转移酶家族基因的克隆与表达 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2016.
Yin YT. Cloning and expressing of lysophosphatidic acid acyltransferases family genes from *Brassica napus* L. [J]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2016.

[20] Chen G, Van Erp H, Martin-Moreno J, et al. Expression of *Castor* LPAT2 enhances ricinoleic acid content at the Sn-2 position of triacylglycerols in *Lesquerella* seed [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(4): 507.

[21] Meesapyodsuk D, Chen Y, Ye SJ, et al. Co-expressing *Eranthis hyemalis* lysophosphatidic acid acyltransferase 2 and elongase improves two very long chain polyunsaturated fatty acid production in *Brassica carinata* [J]. Metab Eng Commun, 2021, 12: e00171.

[22] 李昕儒. 油莎豆溶血磷脂酸酰基转移酶基因(*CeLPATs*)的鉴定及功能分析 [D]. 太谷: 山西农业大学, 2023.
Li XR. Identification and functional analysis of lysophosphatidic acid acyltransferase gene (*CeLPATs*) in *Cyperus esculentus* [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2023.

[23] 陈四龙, 黄家权, 雷永, 等. 花生溶血磷脂酸酰基转移酶基因的克隆与表达分析 [J]. 作物学报, 2012, 38(2): 245-255.
Chen SL, Huang JQ, Lei Y, et al. Cloning and expression analysis of lysophosphatidic acid acyltransferase (*LPAT*) encoding gene in peanut [J]. Acta Agron Sin, 2012, 38(2): 245-255.

[24] 丁检, 吴双, 蔡彩平, 等. 棉花溶血磷酸酯酰转移酶(LPAT)家族基因的发掘和表达分析 [J]. 作物学报, 2015, 41(3): 378-385.
Ding J, Wu S, Cai CP, et al. Genome-wide identification of lysophosphatidic acid acyltransferase gene family and their expression analysis in cotton [J]. Acta Agron Sin, 2015, 41(3): 378-385.

[25] Yang Z, Wang K, Aziz U, et al. Evaluation of duplicated reference genes for quantitative real-time PCR analysis in genome unknown hexaploid oat (*Avena sativa* L.) [J]. Plant Meth, 2020, 16: 138.

[26] Zhou YL, Huang XS, Hu T, et al. Genome-wide analysis of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) family in *Perilla frutescens* and functional characterization of PfGPAT9 crucial for biosynthesis of storage oils rich in high-value lipids [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(20): 15106.

[27] Huang XS, Zhou YL, Shi XF, et al. PfbZIP85 transcription factor mediates ω-3 fatty acid-enriched oil biosynthesis by down-regulating *PfLPAT1B* gene expression in plant tissues [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(8): 4375.

[28] 汪慧慧, 胡蓉, 岳宁燕, 等. 植物*LPATs*基因研究进展 [J]. 分子植物育种, 2020, 18(4): 1138-1143.
Wang HH, Hu R, Yue NY, et al. Research progress on lysophosphatidic acid acyltransferase (*LPATs*) gene in plants [J]. Mol Plant Breed, 2020, 18(4): 1138-1143.

[29] 王晓琳, 曲鹏, 甘明洋, 等. 橡胶树*HbLPAT2*基因的克隆与表达分析 [J]. 热带作物学报, 2024, 45(12): 2515-2523.
Wang XL, Qu P, Gan MY, et al. Cloning and expression analysis of *HbLPAT2* gene from *Hevea brasiliensis* [J]. J Trop Crops, 2024, 45(12), 2515-2523.

[30] 杨琳, 徐宗乐, 崔玮桐, 等. 核桃溶血磷脂酸酰基转移酶基因家族分析 [J]. 河南农业大学学报, 2025, 59(6): 977-987.
Yang L, Xu ZL, Cui WT, et al. Analysis of the gene family of walnut lysophosphatidic acid acyltransferase [J]. J Henan Agric Univ, 2025, 59(6): 977-987.

[31] Maisonneuve S, Bessoule JJ, Lessire R, et al. Expression of rapeseed microsomal lysophosphatidic acid acyltransferase isozymes enhances seed oil content in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2010, 152(2): 670-684.

[32] Kim HJ, Silva JE, Iskandarov U, et al. Structurally divergent lysophosphatidic acid acyltransferases with high selectivity for saturated medium chain fatty acids from *Cuphea* seeds [J]. Plant J, 2015, 84(5): 1021-1033.

[33] 张军平, 江木兰, 龚阳敏, 等. 三角褐指藻*LPAAT*基因在酵母中表达对脂肪酸的影响 [J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(5): 483-488.
Zhang JP, Jiang ML, Gong YM, et al. Influence of expression of *Phaeodactylum tricornutum LPAAT* gene in yeast on oil content and fatty acid composition of TAG [J]. Chin J Oil Crop Sci, 2012, 34(5): 483-488.

[34] Wang YN, Yan JQ, Yang M, et al. EgMADS3 directly regulates EgLPAAT to mediate medium-chain fatty acids (MCFA) anabolism in the mesocarp of oil palm [J]. Plant Cell Rep, 2024, 43(4): 107.

[35] Shams MR, Razvi K, Rahnama H, et al. Enhanced seed oil content by overexpressing *LPAAT* and *WRI1* genes in tobacco plant [J]. Plant Cell Rep, 2025, 44(7): 163.

（责任编辑　朱琳峰）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):98-107

藜麦*G6PDH*基因家族的鉴定及*CqG6PDH1*耐盐性分析

王亦学 刘佳慧 许帆 胡鑫 王育川 侯丽媛 吴慎杰 郝曜山* 董艳辉*
（山西农业大学生命科学学院，太原 030031）

摘 要： 【目的】基于藜麦基因组和转录组数据，鉴定藜麦*G6PDH*基因家族成员，并探究候选基因*CqG6PDH1*在耐盐方面的功能，为藜麦耐盐机制的研究提供理论依据和基因资源。【方法】根据拟南芥*AtG6PDH*和水稻*OsG6PDH*基因家族成员的蛋白序列和G6PDH对应的隐马尔可夫文件PF02781和PF00479，对*CqG6PDH*基因家族成员进行鉴定。利用TBtools、MEGA、MEME和WoLF PSORT等工具分析基因家族成员的理化性质、进化关系、基因结构、保守基序、染色体定位、亚细胞定位和表达模式。运用RT-qPCR分析*CqG6PDH1*在不同组织和盐胁迫下的表达模式，通过转化拟南芥对其耐盐性进行功能验证。【结果】鉴定获得6个*CqG6PDH*基因家族成员，编码蛋白的氨基酸数目为519-722，预测蛋白分子量为59.30-79.58 kD，理论等电点为5.24-8.69。*CqG6PDHs*在第4、5、11、12和14染色体上均有分布，预测其编码的蛋白定位于细胞质和叶绿体。RNA-Seq数据和RT-qPCR表明，*CqG6PDH1*响应盐胁迫。转基因结果显示，分别用175和250 mmol/L NaCl处理转基因拟南芥种子和幼苗，过表达*CqG6PDH1*拟南芥的萌发率和存活率均显著提高，失水速率和丙二醛含量降低，SOD和POD活性及细胞膜稳定性增强。【结论】从藜麦基因组中鉴定到6个*CqG6PDH*基因家族成员，其中，过表达*CqG6PDH1*增强转基因拟南芥的耐盐性，其在应答盐胁迫的调控过程中具有重要作用，是改良作物耐盐性的重要候选基因。

关键词： 藜麦；*G6PDH*基因家族；生物信息学分析；*CqG6PDH1*；耐盐性
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1388

Identification of *G6PDH* Gene Family in *Chenopodium quinoa* and Functional Analysis of *CqG6PDH1* in Salt Tolerance

WANG Yi-xue LIU Jia-hui XU Fan HU Xin WANG Yu-chuan HOU Li-yuan WU Shen-jie HAO Yao-shan* DONG Yan-hui*
(*College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taiyuan* 030031)

Abstract: 【Objective】 Based on the information of genome and transcriptome, the members of the *G6PDH* gene family in quinoa were identified through bioinformatics methods. The function of the candidate gene *G6PDH1* in salt tolerance was investigated. This study provides theoretical basis and gene resources for researching the salinity tolerance mechanisms in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). 【Method】 Based on the protein sequences of *AtG6PDHs* in *Arabidopsis thaliana* and *OsG6PDHs* in *Oryza sativa*, and the reported hidden markov model (HMM) files PF02781 and PF00479, the *CqG6PDH* gene family members were identified. Various bioinformatics tools such as TBtools, MEGA, MEME and WoLF PSORT were used to analyze the protein physicochemical properties, evolutionary relationships, gene structures, conserved motifs, chromosomal distribution, subcellular localization, and expression pattern of *CqG6PDH* gene family members. Additionally, RT-qPCR was used to analyze the expression pattern of *CqG6PDH1* in different tissues and under salt stress, and *A. thaliana* was used to transform for validating the function of *CqG6PDH1* in salt tolerance. 【Result】 Six *CqG6PDH* gene family members were identified, encoding proteins with 519-722 amino acids, with predicted molecular weights ranging from 59.30 to 79.58 kD and theoretical isoelectric points ranging from 5.24 to 8.69. *CqG6PDHs* were distributed on chromosomes 4, 5, 11, 12, and 14, and it is predicted that their encoded proteins were localized in the

收稿日期：2025-12-20
基金项目：山西省科技创新人才团队专项（202304051001040），山西省后稷实验室自主立项课题（202404010930003-Y20），山西农业大学生物育种工程（YZGC135），山西省育种联合攻关（NYGG28-02），山西农业大学科技创新提升工程（CXGC2025065）
*通信作者：郝曜山 haoyaoshan@163.com，董艳辉 dongfang5513@163.com

cytoplasm and chloroplast. RNA-Seq data and RT-qPCR indicated that *CqG6PDH1* responded to salt stress. The seeds and seedlings of transgenic *Arabidopsis* were treated with 175 and 250 mmol/L NaCl, respectively, the germination rate and the survival rate of *Arabidopsis* overexpressing *CqG6PDH1* significantly increased, accompanied by low water loss rate and malondialdehyde (MDA) content, as well as enhanced SOD activity, POD activity and cell membrane stability.【Conclusion】Six *CqG6PDH* genes are identified in the quinoa and overexpressing *CqG6PDH1* in *Arabidopsis* resulted in enhanced tolerance to salt. *CqG6PDH1* is an important candidate gene for improving crop tolerance to salt and plays an important role in the regulatory process of responding to salt stress.

Keywords: quinoa; *G6PDH* gene family; bioinformatics analysis; *CqG6PDH1*; salinity tolerance

藜麦（*Chenopodium quinoa* Willd.）为一年生苋科藜亚科藜属植物，起源于南美安第斯地区，已有7 000多年的种植历史[1]。20世纪90年代，藜麦引入中国，在青海、甘肃、山西、河北、内蒙古等省自治区推广种植。藜麦营养丰富，富含多种矿物质、维生素、膳食纤维、脂肪酸和蛋白质，被联合国粮农组织认定为最适宜人类的全营养食品[2]。此外，藜麦含有皂苷、黄酮、多酚等对人体有益的生物活性成分，能够预防心血管疾病，具有抗氧化和抗癌的作用[3]。藜麦是异源四倍体植物，具有丰富的遗传多样性，抗旱耐盐耐瘠薄，因此，发掘藜麦种质资源中优异的抗逆基因并进行功能研究，不仅对揭示藜麦抗逆机理具有理论价值，对于保障藜麦安全生产也具有重要的现实意义。

戊糖磷酸途径（pentose phosphate pathway, PPP）是植物体内葡萄糖氧化分解的一种很重要的有氧呼吸途径，为生物合成提供还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（triphosphopyridine nucleotide, NADPH），生成脂肪酸、氨基酸合成所需的中间产物，核酸代谢所需的磷酸戊糖，参与植物对胁迫的应答反应[4]。在PPP途径中，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH）作为关键限速酶，控制PPP途径的反应速率，催化NADPH的生成，在植物生长发育和逆境胁迫响应过程中发挥重要作用[5-6]。近年来，植物中*G6PDHs*基因的鉴定和功能研究越来越多。小麦*TaG6PDH*在外源脱落酸和冷胁迫处理下，其表达和活性水平提高，冷胁迫处理过表达*Ta6PGDH*拟南芥，过表达植株具有更强的活性氧清除能力和更高的成活率[7]。玉米中有5个*ZmG6PGDHs*，敲除*ZmG6PDH1*则增强玉米对冷胁迫的敏感性，突变体在冷胁迫处理后，NADPH、抗坏血酸和谷胱甘肽的氧化还原状态发生了显著变化，从而导致氧化还原平衡破坏和活性氧的增加，使得细胞损伤和死亡[8]。大豆胞质型*GmG6PDH7*受盐胁迫诱导，过表达该基因的拟南芥在盐胁迫处理时种子的萌发率提高，根长变长，且盐胁迫诱导转基因植株G6PDH总活性和胞浆G6PDH活性均明显升高，活性氧水平显著降低[9]。甘蔗*ScG6PDH*在盐、干旱、重金属（$CdCl_2$）和低温（4 ℃）处理条件下，其转录水平显著上调，表明该基因可能参与以上环境胁迫的生理代谢过程[10]。过表达杨树胞质型*PsG6PDH*的转基因烟草表现出更强的耐寒性，转基因烟草的丙二醛含量和电解质渗漏含量较低，SOD和POD活性较高，此外，*PsG6PDH*激活转基因烟草中*NtERD10b*、*NtERD10c*、*NtSOD*等胁迫相关基因的表达[11]。

目前，已相继在拟南芥[12]、马铃薯[13]、大豆[14]、小麦[15]、橡胶树[16]、草莓[17]等植物中对*G6PDH*基因家族成员进行分离鉴定、表达分析和功能验证，其广泛参与了植物的生长发育和逆境胁迫响应过程。然而，藜麦*G6PDH*基因家族成员及其生物学功能仍不清楚。

本研究利用生物信息学方法鉴定藜麦*G6PDH*基因家族成员，并对其理化性质、进化关系、基因结构、保守基序、染色体位置、亚细胞定位等进行预测分析。通过RNA-Seq数据和表达模式分析筛选响应盐胁迫的候选基因，通过转基因拟南芥表型鉴定、生理生化指标测定等研究候选基因在耐盐方面的功能，为藜麦耐盐机制研究提供理论依据和基因资源。

1　材料与方法

1.1　材料

藜麦品种晋藜1号由山西农业大学生命科学学院藜麦种质创新课题组选育和保存，该品种已通过认定，编号晋认藜202001。拟南芥Col-0用于目标基因的遗传转化和功能验证。

1.2 方法

1.2.1 藜麦*G6PDH*基因家族成员的鉴定 从Ensembl Plants数据库（https://plants.ensembl.org/index.html）下载藜麦基因组文件；从TAIR（https://www.arabidopsis.org/）下载拟南芥*AtG6PDH*家族6个成员的蛋白序列；从Rice Genome Annotation Project（https://rice.uga.edu/）下载水稻*OsG6PDH*家族5个成员的蛋白序列。从Pfam数据库（http://pfam.xfam.org/）下载隐马尔可夫模型（HMM）文件，包括C端NADP依赖性G6PD结构域（PF02781）和N端NADP结合结构域（PF00479）。使用TBtools的HMM search搜索含有上述2个结构域的G6PDH蛋白，参数为默认值；以拟南芥[12]和水稻[15]的G6PDH蛋白序列为查询序列，在藜麦基因组蛋白数据库中本地BLASTP搜索，E-value值小于10^{-5}；结合HMM search和BLASTP 2种方法获得藜麦*G6PDH*基因家族成员，经删除重复及冗余后，进一步通过NCBI Batch CD-search（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi）确认结构域，最终获得候选*CqG6PDH*成员。

1.2.2 藜麦*G6PDH*基因家族蛋白的理化性质分析和亚细胞定位预测 提取*CqG6PDH*基因家族成员蛋白序列信息，利用TBtools软件protein paramter calc模块预测其氨基酸长度、相对分子量、理论等电点、不稳定系数和总平均亲水性等理化性质。利用在线网站WoLF PSORT（https://wolfpsort.hgc.jp/）对*CqG6PDH*基因家族成员亚细胞定位进行预测，生物类型为植物。

1.2.3 藜麦*G6PDH*基因家族系统进化树构建 利用拟南芥AtG6PDH家族6个成员的蛋白序列和水稻OsG6PDH家族5个成员的蛋白序列，以及藜麦CqG6PDH蛋白序列，MEGA6.0软件采用NJ（neighbor joining）法构建系统发育进化树，Bootstrap参数设置为1 000。

1.2.4 藜麦*G6PDH*基因家族的基因结构和保守基序分析 利用TBtools软件中的Visualize Gene Strcuture模块分析并可视化基因结构特征。通过在线网站MEME（https://meme-suite.org/meme/tools/meme）分析保守基序，最大参数设置为10，其余参数默认，利用TBtools软件中的Visualize Motif Pattern模块进行可视化。

1.2.5 藜麦*G6PDH*家族基因的表达分析 藜麦RNA-Seq数据来源于NCBI中Sequence Read Archive（SRA）转录组测序结果（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra），包括不同组织和盐胁迫下的转录组（GenBank：SRP278144、SRP247883）[18]。将TPM（每百万读取转录本）形式的RNA-seq数据进行归一化并进行$\log_2$转换，利用TBtools生成热图。

挑选籽粒饱满的藜麦种子，经75%乙醇消毒后，于培养皿中进行催芽，待种子萌发出子叶时进行水培种植，六叶期，采取藜麦幼苗的叶、根和茎，同时对幼苗进行200 mmol/L NaCl处理，分别于0、0.5、1、3、6、9、12和24 h取幼苗的根，用于不同组织和盐胁迫条件下的基因表达分析。上述样品取样后液氮速冻，-80 ℃保存备用。提取上述样品的RNA并反转录成cDNA，以*CqPRN*为内参基因（附表1）进行RT-qPCR，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法进行数据分析。

1.2.6 藜麦*CqG6PDH1*的克隆和拟南芥转化 利用*CqG6PDH1*参考序列设计引物CqG6PDH1-F和CqG6PDH1-R，进行扩增并测序。将目标基因的氨基酸序列提交到NCBI数据库中，进行BLASTP比对后得到其他物种中的同源序列，利用DNAman进行蛋白序列比对分析。扩增产物经*Hin*d III和*Kpn* I双酶切后与植物过表达载体pCAMBIA1300连接，构建重组载体，通过热激法转化农杆菌GV3101，采用蘸花法进行拟南芥的转化[19]。拟南芥培养条件为23 ℃，光周期为16 h光照/8 h黑暗，经潮霉素抗性筛选和PCR检测后获得T_3纯合转基因株系，用于后续试验。

1.2.7 转*CqG6PDH1*拟南芥的耐盐性分析 将野生型（wild type, WT）和转基因拟南芥种子播种于MS培养基和添加175 mmol/L NaCl的MS培养基上，4 ℃春化处理2 d，随后在光照培养箱中培养1周，观察生长情况，计算萌发率，每个处理设3次重复。

分别取20株长势一致的WT和转基因拟南芥幼苗转移到经250 mmol/L NaCl浸泡过的滤纸上，12 h后，用ddH_2O充分漂洗并用纸吸干水分，放入装有5 mL ddH_2O的离心管中，用DDS-1型电导仪测定其煮前电导率（A），然后，沸水煮30 min，室温冷却后测其煮后电导率（B）。估算细胞膜稳定性（cell membrane stability, CMS），CMS（%）=（1–A/B）×

100%，每个样品重复3次[20]。

分别选取15株5周龄大小均匀一致的拟南芥幼苗（WT和转基因拟南芥），称其鲜重（A），每隔1 h连续称重（B），最后烘干至恒重（C），计算叶片失水速率（water loss rate, WLR），WLR（%）=（B–C）/（A–C）×100%，每个样品重复3次。

选取5周龄植株用250 mmol/L NaCl溶液进行盐胁迫处理，3 d后，用北京索莱宝科技有限公司试剂盒测定WT和转基因拟南芥的丙二醛（malondialdehyde, MDA）含量、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）和过氧化物酶（peroxidase, POD）活性。一周后观察生长情况并计算存活率，每个处理3次重复。

1.2.8　数据统计　利用Excel 2019软件进行数据整理和绘图。利用SPSS软件进行显著性分析。

2　结果

2.1　藜麦*G6PDH*基因家族成员的鉴定和特征分析

以拟南芥*AtG6PDH*成员和水稻*OsG6PDH*成员为原始序列，经过BLASTP鉴定和Pfam结构域PF02781和PF00479筛选，删除重复及冗余序列后，共得到6个*CqG6PDH*候选成员，其中5个分别位于5条染色体上（Chr.04、Chr.05、Chr.11、Chr.12和Chr.14），按照其在染色体上的位置，将其命名为*CqG6PDH1–CqG6PDH6*。理化性质分析表明，*CqG6PDH*基因家族成员的蛋白质长度为519–722 aa，分子质量为59.30–79.58 kD，理论等电点为5.24–8.69。蛋白质不稳定系数表明，所有成员不稳定系数大于40，均属于不稳定蛋白。所有蛋白总平均亲水性为负值，表明所有蛋白均为亲水蛋白。亚细胞定位预测，CqG6PDH1和CqG6PDH3定位于细胞质，其余成员定位于叶绿体（表1）。

表1　藜麦*G6PDH*基因家族成员信息

Table 1　Information about *G6PDH* gene family members of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.)

基因 Gene	基因ID Gene ID	染色体位置 Chromosome distribution	长度 Length（aa）	分子量 MW（kD）	等电点 pI	不稳定系数 Instability index	总平均亲水性 GRAVY	亚细胞定位 Subcellular location
CqG6PDH1	AUR62018096-RA	Chr.04,36190960–36202858	519	59.42	6.71	42.68	-0.419	细胞质Cytoplasm
CqG6PDH2	AUR62006786-RA	Chr.05,76135361–76150678	722	79.58	7.24	43.99	-0.266	叶绿体Chloroplast
CqG6PDH3	AUR62031998-RA	Chr.11,28856918–28875861	578	65.58	5.24	43.16	-0.537	细胞质Cytoplasm
CqG6PDH4	AUR62000441-RA	Chr.12,4929849–4939869	652	72.92	6.18	47.43	-0.129	叶绿体Chloroplast
CqG6PDH5	AUR62005655-RA	Chr.14,55157363–55161143	569	64.48	8.04	43.28	-0.380	叶绿体Chloroplast
CqG6PDH6	AUR62029100-RA	Chr.00,39600961–39607326	527	59.30	8.69	46.13	-0.237	叶绿体Chloroplast

2.2　藜麦*G6PDH*基因家族的系统进化分析

通过对6个*CqG6PDHs*、6个*AtG6PDHs*和5个*OsG6PDHs*基因家族成员的蛋白序列进行系统进化分析。结果显示（图1），*CqG6PDHs*同其他2个物种一样，均被分为胞质型（cytosolic, Cy）和质体型（plastidial, P），质体型又被分为P0、P1和P2 3种类型。其中，*CqG6PDH1*和*CqG6PDH3*为Cy型；*CqG6PDH2*和*CqG6PDH4*为P0型；*CqG6PDH6*和*CqG6PDH5*分别为P1和P2 2个亚型。除了P0型以外，系统进化树中藜麦和拟南芥G6PDH蛋白单独聚类在更小的分支上，表明藜麦*G6PDH*与拟南芥*G6PDH*基因家族亲缘关系较近。

2.3　藜麦*G6PDH*基因家族基因结构和保守基序分析

*CqG6PDH*基因家族基因结构分析显示，不同成员外显子和内含子数量各不相同，外显子数量为8–15个，内含子数量为7–14个，其中，*CqG6PDH3*的外显子和内含子数量最多，胞质型*CqG6PDH*的外显子和内含子数量多于质体型*CqG6PDH*；在质体型*CqG6PDH*中，P0型的外显子和内含子数量最多，P2型次之，P1型最少（图2-A）。通过对*CqG6PDH*的保守基序进行分析，结果显示，P0型的*CqG6PDH2*和*CqG6PDH4*不含有Motif3，其余成员不含有Motif10。此外，Motif4含有底物结合位点，Motif1含有$NADP^+$结合位点（图2-B）。

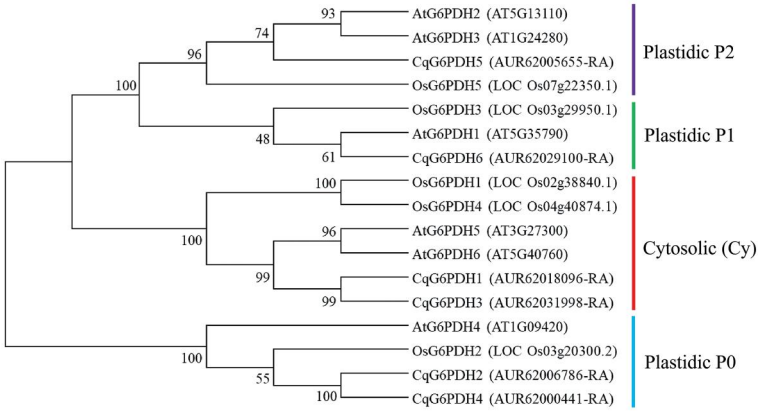


图1 藜麦、拟南芥和水稻*G6PDH*基因家族的系统发育进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of *G6PDH* gene family in *Chenopodium quinoa*, *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*

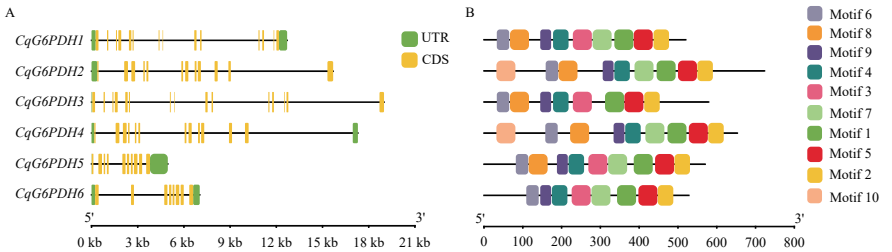


图2 藜麦*G6PDH*基因家族的基因结构(A)和保守基序(B)

Fig. 2 Gene structures (A) and conserved domains (B) of *G6PDH* gene family in *C. quinoa*

2.4 藜麦*G6PDH*基因家族的表达分析

基于已公布的藜麦在不同组织和盐胁迫下的RNA-Seq数据，绘制藜麦*G6PDH*基因家族成员的表达热图。按不同组织相对表达量的高低，6个*CqG6PDH*成员可分为2组，*CqG6PDH1*和*CqG6PDH2*在藜麦的根部表达量较高，在叶和茎部表达量较低；其他成员在这3种组织中表达量较低，其中，*CqG6PDH6*在叶和茎部的表达量高于根部（图3-A）。在盐胁迫下，6个*CqG6PDHs*的表达水平大致可分为3组，在盐敏感材料Q30和耐盐材料Q68中，*CqG6PDH6*在藜麦芽部的表达水平均显著高于根部；而*CqG6PDH1*和*CqG6PDH5*在根部的表达水平高于芽部，其中，*CqG6PDH1*在盐胁迫处理后，根部的表达水平在盐敏感材料Q30和耐盐材料Q68中均有响应，因此，选择*CqG6PDH1*进行下一步研究；其余3个成员在盐胁迫下表达量较低（图3-B）。

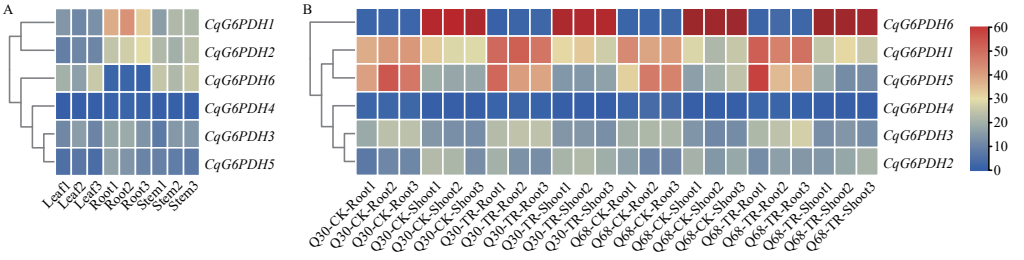


图3 藜麦*G6PDH*基因家族在不同组织(A)和盐胁迫(B)的表达热图

Fig. 3 Expression heat map of *CqG6PDH* gene family in different tissues (A) and salt stress (B) in *C. quinoa*

2.5　藜麦*CqG6PDH1*的克隆及表达分析

以晋藜1号的cDNA为模板扩增*CqG6PDH1*。结果表明，*CqG6PDH1*序列全长1 560 bp（图4-A），编码519个氨基酸，预测其蛋白分子量为59.42 kD，等电点为6.71，命名为*CqG6PDH1*。

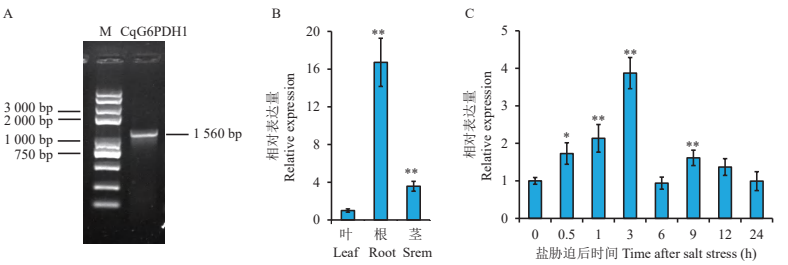
经组织特异性表达模式分析，*CqG6PDH1*在根部表达量最高，茎部次之，叶部最少，其根部的表达量是叶部的16.7倍（图4-B）。盐胁迫后，*CqG6PDH1*在根部的表达量呈现先升高后降低的趋势，在处理3 h时达到峰值，为处理前的3.9倍，表明该基因响应盐胁迫（图4-C）。

2.6　藜麦CqG6PDH1的序列比对

氨基酸序列比对显示，CqG6PDH1与其他物种氨基酸序列的相似性为79.23%–87.31%，与苋菜的相似性最高，达87.31%。CqG6PDH1存在保守的罗斯曼折叠GXXGXXG/A（Rossman fold），含有底物结合位点RIDHYLG和$NADP^+$结合位点NEFVMRLQP，其中，$NADP^+$结合位点的氨基酸序列与苋菜一致，而与其他物种则存在一个氨基酸残基的差异。相对于$NADP^+$结合位点，底物结合位点则更加保守，所有物种均一致（图5）。

2.7　转*CqG6PDH1*拟南芥的耐盐性分析

在MS培养基上，WT和转基因拟南芥（L1、L2和L3）的种子均可正常萌发生长，且长势基本一致；在添加175 mmol/L NaCl的MS培养基上，WT和转基因拟南芥的种子萌发后子叶均发黄，但转基因拟南芥的种子萌发速度快于WT（图6-A）。利用RT-qPCR检测T_3代转基因拟南芥（L1、L2和L3）中*CqG6PDH1*的表达量，结果显示，*CqG6PDH1*的表达量依次是WT的7.0、10.6和8.4倍（图6-B）。萌发率统计显示，在添加NaCl的MS培养基上，WT的萌发率为52.2%，而3个转基因拟南芥的萌发率依次为68.9%、69.4%和67.8%，显著高于WT，表明过表达*CqG6PDH1*拟南芥种子的耐盐性得到提高（图6-C）。



* P<0.05，** P<0.01. The same below

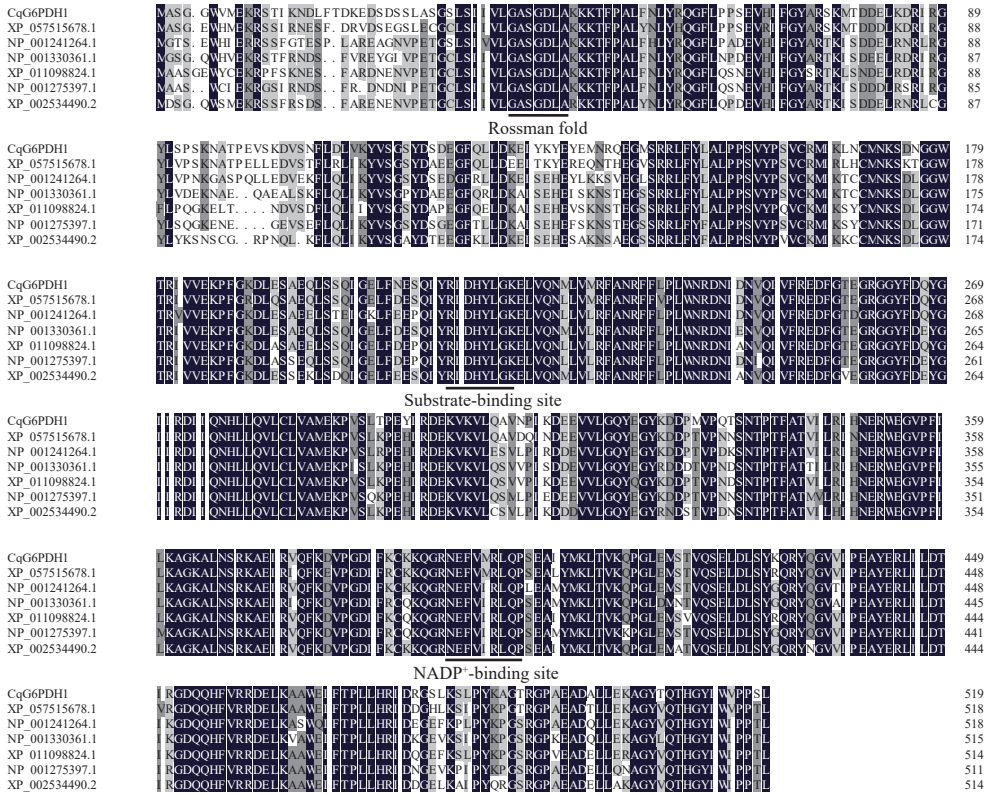
图4　藜麦*CqG6PDH1*的克隆（A）及组织（B）和盐胁迫（C）表达分析

Fig. 4　Gene cloning of *CqG6PDH1* in quinoa (A), and expression analysis in different tissues (B) and salt stress (C)

为进一步评价过表达*CqG6PDH1*拟南芥幼苗对盐胁迫的耐受能力，将5周龄WT和转基因拟南芥用250 mmol/L NaCl溶液进行盐胁迫处理。1周后，WT大部分植株黄化死亡，而转基因拟南芥虽出现植株黄化现象，但部分植株生长点并未死亡（图7-A）。存活率统计显示，WT的存活率为35.0%，而3个转基因拟南芥的存活率依次为63.3%、68.3%和66.7%，显著高于WT（图7-B）。与WT相比，转基因拟南芥在不同时间点的离体叶片失水速率均较低，具有较高的保水能力（图7-C）。NaCl溶液处理之前，转基因拟南芥和WT的细胞膜稳定性无显著差异，处理之后，转基因拟南芥的细胞膜稳定性（61.6%–66.1%）均显著高于WT（42.3%）（图7-D）。丙二醛含量反映膜脂过氧化程度，在盐胁迫处理3 d时，转基因拟南芥丙二醛含量（14.3–16.3 μmol/g FW）均显著低于WT（20.0 μmol/g FW）（图7-E）。SOD和POD是两类关键的抗氧化酶，转基因拟南芥在盐胁迫处理3 d时，SOD活性（314.9–362.7 U/g FW）显著高于WT（230.5 U/g FW）（图7-F）；POD活性（2 975.9–3 201.3 U/g FW）同样显著高于WT（2 129.9 U/g FW）（图7-G）。

3　讨论

G6PDH是戊糖磷酸途径的关键酶，广泛存在于各类高等植物的细胞质和质体中，在植物应对各种

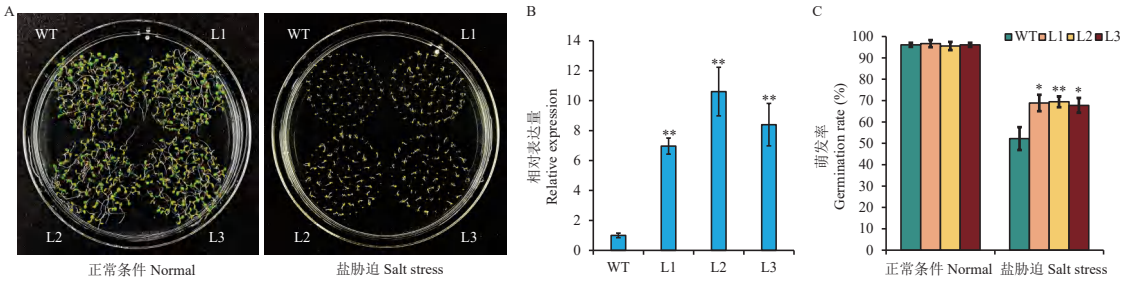


XP_057515678.1：苋菜；NP_001241264.1：大豆；NP_001330361.1：拟南芥；XP_011098824.1：芝麻；NP_001275397.1：马铃薯；XP_002534490.2：蓖麻

XP_057515678.1: *Amaranthus tricolor*; NP_001241264.1: *Glycine max*; NP_001330361.1: *Arabidopsis thaliana*; XP_011098824.1: *Sesamum indicum*; NP_001275397.1: *Solanum tuberosum*; XP_002534490.2: *Ricinus communis*

图5 CqG6PDH1与其他物种的氨基酸序列比对

Fig. 5 Amino acid sequence alignment of CqG6PDH1 with other species



A：萌发表型；B：*CqG6PDH1*的表达分析；C：萌发率统计

A: Germination phenotype. B: Expression analysis of *CqG6PDH1*. C: Statistics of germination rate

图6 过表达*CqG6PDH1*拟南芥种子在NaCl处理下的表型分析

Fig. 6 Phenotype analysis of *Arabidopsis* seeds with over-expressing *CqG6PDH1* under NaCl treatment

环境胁迫和调节生长发育方面具有重要作用。通过生物信息学鉴定和分析*G6PDH*基因家族成员的理化性质和结构特性，有助于解析G6PDH在植物中的作用。本研究鉴定出6个藜麦*G6PDH*基因家族成员，其中2个胞质型，4个质体型，质体型的数量多于胞质型，且均含有内含子，这与其他植物*G6PDH*基因家族成员的亚型分类和基因结构的规律一致[12-14]。蛋白质Motif是蛋白质序列中具有特定结构或功能的

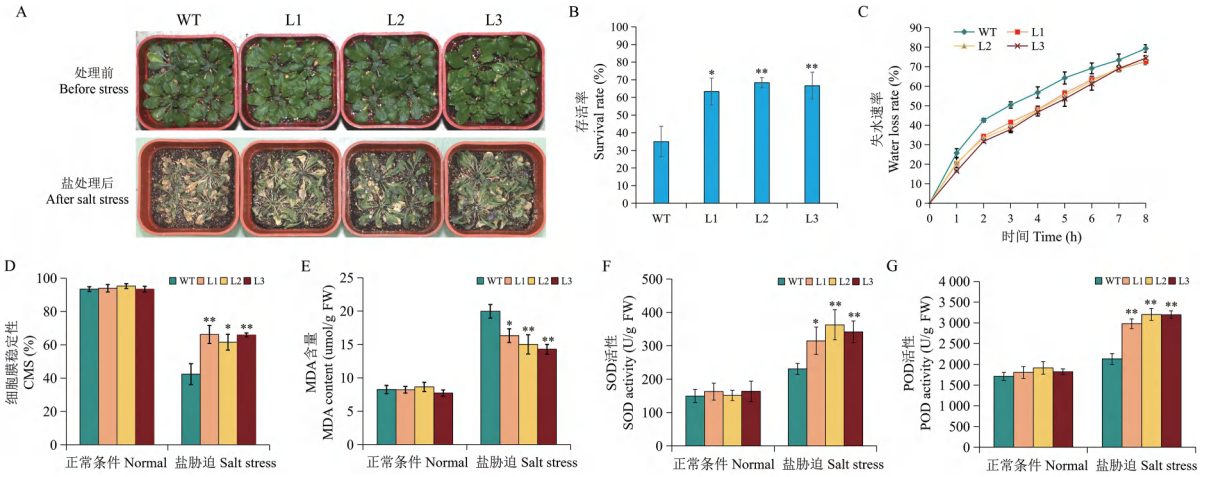


图7　过表达*CqG6PDH1*拟南芥幼苗在NaCl处理下的表型(A)及生理指标测定(B–G)

Fig. 7　Phenotypes (A) of *Arabidopsis* seedlings with over-expressing *CqG6PDH1* under NaCl treatment and determination of physiological indexes (B–G)

短序列，对蛋白的功能预测和分析至关重要[21]。6个藜麦*G6PDH*基因家族成员编码的蛋白均含有Motif4和Motif1，其中，Motif4含有底物结合位点，Motif1含有$NADP^+$结合位点，保证了藜麦G6PDH蛋白的基础功能。此外，P0型的藜麦G6PDH不含有Motif3，其余成员不含有Motif10，推测藜麦G6PDH分化出不同亚型以及各成员包含不同Motif可能是为了更好地响应各类胁迫，发挥不同的生理生化作用。

藜麦是一种兼性盐生植物，部分品种甚至能够耐受海水浓度的盐胁迫，因此，藜麦成为植物耐盐机理研究的重要研究对象[22]。在漫长的进化过程中，藜麦构建起一套复杂的基因调控网络来应对盐胁迫，其中多个基因家族通过调控离子平衡、抗氧化与应激防御响应、转录水平调控及代谢途径调节等过程发挥关键作用[23–24]。挖掘响应盐胁迫的特异表达基因并对其结构及功能进行研究，从分子水平认识藜麦对盐胁迫的适应机理显得尤为重要。本研究基于已公布的藜麦在盐胁迫下的RNA-Seq数据，筛选出响应盐胁迫的*CqG6PDH1*，其编码的蛋白存在保守的罗斯曼折叠、底物结合位点和$NADP^+$结合位点，属于典型的G6PDH蛋白。青稞基因组中鉴定了5个*HvG6PDH*基因，其中，*HvG6PDH1*–*HvG6PDH4*均受盐胁迫诱导[25]。本研究克隆得到的*CqG6PDH1*同样响应盐胁迫，在盐胁迫处理3 h时达到高峰，推测其在应对盐胁迫时发挥重要作用。植物中*G6PDH*基因在不同器官中的表达模式具有差异性，胞质型*G6PDH*广泛存在于所有植物组织中，尤其是在库组织中具有较高的表达丰度[14]。作为胞质型的*CqG6PDH1*在根部表达量显著高于其他组织，这与上述的研究结果一致。

大豆中鉴定了9个*GmG6PDH*成员，*GmG6PDH2*的过表达可以通过调节抗坏血酸和谷胱甘肽的氧化还原状态，抑制活性氧的产生，从而显著增强转基因大豆对盐胁迫的抗性[14]。本研究盐胁迫条件下过表达*CqG6PDH1*的拟南芥的种子萌发率和幼苗存活率均显著提高。细胞膜是保护植物细胞免受外界伤害的有力屏障，也是植物遭受逆境胁迫时首先遭到攻击的部位。丙二醛是植物在逆境中组织或器官受到伤害而产生的脂质氧化反应的最终代谢物，会引起核酸、蛋白质等大分子的交联聚合，是评价植物抗逆性的重要指标[26]。本研究中，盐胁迫条件下过表达*CqG6PDH1*拟南芥丙二醛含量降低，细胞膜稳定性增强，推测*CqG6PDH1*在维持盐胁迫下的氧化还原平衡中起重要作用。红芸豆G6PDH在盐胁迫下的抗氧化应激过程中起关键作用[27]。研究表明，G6PDH在植物抵御逆境胁迫过程中可能的作用机制是催化产生NADPH，使得抗氧化酶如SOD、POD等活性增强，维持氧化还原平衡，从而保护植物免受氧化胁迫伤害[28–29]。本研究中，过表达*CqG6PDH1*的拟南芥幼苗在盐胁迫条件下SOD和

POD活性增强，推测*CqG6PDH1*可降低细胞内的氧化应激水平，从而维持SOD和POD的活性和稳定性。胁迫可以诱导拟南芥G6PDH被糖原合成酶激酶（glycogen synthase kinase3, GSK3）磷酸化，从而维持拟南芥细胞的氧化还原平衡，提高胁迫耐受性[30]。CqG6PDH1是否可以被相关激酶磷酸化及其耐盐的分子机制，需进一步研究。

4 结论

共鉴定到6个藜麦*G6PDH*基因家族成员，分布于不同的染色体上，其中*CqG6PDH1*和*CqG6PDH3*为Cy型；*CqG6PDH2*和*CqG6PDH4*为P0型；*CqG6PDH6*和*CqG6PDH5*分别为P1和P2 2个亚型。筛选出响应盐胁迫基因*CqG6PDH1*。在盐胁迫条件下，转*CqG6PDH1*拟南芥的种子萌发率和幼苗存活率均显著提高，失水速率和丙二醛含量降低，SOD和POD活性及细胞膜稳定性增强。*CqG6PDH1*是改良作物耐盐性的重要候选基因。

文章所有附表数据请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260424171838_NewsFile_16.pdf）。

参考文献

[1] Jacobsen SE. The worldwide potential for quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) [J]. Food Rev Int, 2003, 19(1/2): 167-177.

[2] Angeli V, Miguel Silva P, Crispim Massuela D, et al. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): an overview of the potentials of the "golden grain" and socio-economic and environmental aspects of its cultivation and marketization [J]. Foods, 2020, 9(2): 216.

[3] 胡一晨, 赵钢, 秦培友, 等. 藜麦活性成分研究进展 [J]. 作物学报, 2018, 44(11): 1579-1591.
Hu YC, Zhao G, Qin PY, et al. Research progress on bioactive components of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) [J]. Acta Agron Sin, 2018, 44(11): 1579-1591.

[4] 于定群, 汤浩茹, 张勇, 等. 高等植物葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的研究进展 [J]. 生物工程学报, 2012, 28(7): 800-812.
Yu DQ, Tang HR, Zhang Y, et al. Research progress in glucose-6-phosphate dehydrogenase in higher plants [J]. Chin J Biotechnol, 2012, 28(7): 800-812.

[5] Wang XM, Ma YY, Huang CH, et al. Involvement of glucose-6-phosphate dehydrogenase in reduced glutathione maintenance and hydrogen peroxide signal under salt stress [J]. Plant Signal Behav, 2008, 3(6): 394-395.

[6] Scharte J, Schön H, Tjaden Z, et al. Isoenzyme replacement of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the cytosol improves stress tolerance in plants [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(19): 8061-8066.

[7] Tian Y, Peng KK, Bao YZ, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase genes of winter wheat enhance the cold tolerance of transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol Biochem, 2021, 161: 86-97.

[8] Li X, Cai Q, Yu T, et al. ZmG6PDH1 in glucose-6-phosphate dehydrogenase family enhances cold stress tolerance in maize [J]. Front Plant Sci, 2023, 14: 1116237.

[9] Jin J, Li KK, Qin J, et al. The response mechanism to salt stress in *Arabidopsis* transgenic lines over-expressing of *GmG6PD* [J]. Plant Physiol Biochem, 2021, 162: 74-85.

[10] Yang YT, Fu ZW, Su YC, et al. A cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase gene, *ScG6PDH*, plays a positive role in response to various abiotic stresses in sugarcane [J]. Sci Rep, 2014, 4: 7090.

[11] Lin YZ, Lin SZ, Guo H, et al. Functional analysis of PsG6PDH, a cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase gene from *Populus suaveolens*, and its contribution to cold tolerance improvement in tobacco plants [J]. Biotechnol Lett, 2013, 35(9): 1509-1518.

[12] Wakao S, Benning C. Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2005, 41(2): 243-256.

[13] 宋兵芳, 柳宁, 程新艳, 等. 马铃薯*G6PDH*基因家族鉴定及其在损伤块茎的表达分析 [J]. 生物技术通报, 2024, 40(9): 104-112.
Song BF, Liu N, Cheng XY, et al. Identification of potato *G6PDH* gene family and its expression analysis in damaged tubers [J]. Biotechnol Bull, 2024, 40(9): 104-112.

[14] Zhao Y, Cui YF, Huang SY, et al. Genome-wide analysis of the glucose-6-phosphate dehydrogenase family in soybean and functional identification of GmG6PDH2 involvement in salt stress [J]. Front Plant Sci, 2020, 11: 214.

[15] 车卓, 张沛沛, 陈涛, 等. 小麦*G6PDH*基因家族的鉴定与表达分析 [J]. 麦类作物学报, 2023, 43(8): 947-957.
Che Z, Zhang PP, Chen T, et al. Identification and expression analysis of *G6PDH* gene family in wheat [J]. J Triticeae Crops, 2023, 43(8): 947-957.

[16] Long XY, He B, Fang YJ, et al. Identification and characterization of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene family in the para rubber tree, *Hevea brasiliensis* [J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 215.

[17] Zhang YT, Luo MW, Cheng LJ, et al. Identification of the cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase gene from strawberry involved in cold stress response [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(19): 7322.

[18] Ding PC, Tang P, Li XF, et al. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of the *R2R3-MYB* gene family in quinoa (*Chenopodium quinoa*) under abiotic stress [J]. Funct Plant Biol, 2024, 51: FP23261.

[19] Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 1998, 16(6): 735-743.

[20] Xu QF, Mao XG, Wang YX, et al. A wheat gene *TaSAP17-D* encoding an AN1/AN1 zinc finger protein improves salt stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. J Integr Agric, 2018, 17(3): 507-516.

[21] Smaili FZ, Tian SY, Roy A, et al. QAUST: protein function prediction using structure similarity, protein interaction, and functional motifs [J]. Genom Proteom Bioinform, 2021, 19(6): 998-1011.

[22] 李丽丽, 姜奇彦, 牛风娟, 等. 藜麦耐盐机制研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2016, 18(2): 31-40.
Li LL, Jiang QY, Niu FJ, et al. Research progress on salt tolerance mechanisms in quinoa [J]. J Agric Sci Technol, 2016, 18(2): 31-40.

[23] 鲍庆晗, 王洋. 藜麦响应盐碱胁迫的基因家族功能与信号通路研究进展 [J]. 吉林师范大学学报: 自然科学版, 2025, 46(4): 96-100.
Bao QH, Wang Y. Research progress on gene family functions and signaling pathways of quinoa in response to saline-alkali stress [J]. Jilin Norm Univ J Nat Sci Ed, 2025, 46(4): 96-100.

[24] 王洋, 潘晓为, 杜会石, 等. 藜麦植物资源开发利用与抗逆性研究进展 [J]. 吉林师范大学学报: 自然科学版, 2023, 44(4): 118-122.
Wang Y, Pan XW, Du HS, et al. Research progress in the utilization and stress resistance on the plant resource of quinoa [J]. J Jilin Norm Univ Nat Sci Ed, 2023, 44(4): 118-122.

[25] Feng RJ, Wang XM, He L, et al. Identification, characterization, and stress responsiveness of glucose-6-phosphate dehydrogenase genes in highland barley [J]. Plants, 2020, 9(12): 1800.

[26] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance [J]. Annu Rev Plant Biol, 2008, 59: 651-681.

[27] Liu Y, Wu R, Wan Q, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a pivotal role in nitric oxide-involved defense against oxidative stress under salt stress in red kidney bean roots [J]. Plant Cell Physiol, 2007, 48(3): 511-522.

[28] Wang HH, Yang LD, Li Y, et al. Involvement of ABA- and H_2O_2-dependent cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase in maintaining redox homeostasis in soybean roots under drought stress [J]. Plant Physiol Biochem, 2016, 107: 126-136.

[29] Liu J, Wang XM, Hu YF, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a pivotal role in tolerance to drought stress in soybean roots [J]. Plant Cell Rep, 2013, 32(3): 415-429.

[30] Dal Santo S, Stampfl H, Krasensky J, et al. Stress-induced GSK3 regulates the redox stress response by phosphorylating glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2012, 24 (8): 3380-3392.

（责任编辑　李楠）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):108-121

参薯*WRKY*基因家族鉴定及其在线虫胁迫响应及激素信号调控中的作用

王明珠[1#] 孙林涛[1#] 常英英[1] 张江利[1] 高锦[1, 2*] 王瑞飞[1, 2] 张昊[1, 2]
李明军[1] 杨清香[1, 2*]
（1.河南师范大学生命科学学院,新乡 453007; 2.河南省农业微生物生态与技术国际联合实验室,新乡 453007）

摘 要:【目的】系统鉴定参薯（*Dioscorea alata*）*WRKY*基因家族成员并解析其基本特征，为研究该家族成员在参薯响应根结线虫胁迫中的功能奠定基础。【方法】基于参薯全基因组数据，利用生物信息学方法对*DaWRKY*基因家族进行系统鉴定，并分析其蛋白理化性质、系统进化关系、基因结构、染色体定位及启动子顺式作用元件。进一步结合转录组数据与RT-qPCR实验，分析*DaWRKY*基因在不同组织、南方根结线虫胁迫以及植物激素（ABA、JA、SA）处理下的表达模式。【结果】*DaWRKY*基因家族包含70个成员，编码蛋白氨基酸数量为127-651，均为亲水性蛋白，预测定位均在细胞核。系统进化分析将其划分为I、II、III三个亚族，其中II亚族占比最高（65.71%）。染色体定位结果显示，该家族成员不均匀分布在15条染色体上。表达谱分析表明，*DaWRKY*基因在根和微型块茎中显著富集。在南方根结线虫胁迫下，8个*DaWRKY*基因在7 d均上调表达，其中*DaWRKY2*上调表达倍数最高；在ABA处理中，仅*DaWRKY33*在1-5 d下调，而*DaWRKY26*上调最显著；JA处理诱导*DaWRKY33*、*DaWRKY69*表达呈现先降后升的趋势，且8个基因在12 h均表现为上调；SA处理中，除*DaWRKY16*外，其他基因均在12 h表达上调。【结论】鉴定出参薯70个*DaWRKY*转录因子，其中*DaWRKY2*、*DaWRKY33*、*DaWRKY46*等成员在根结线虫侵染与ABA、JA、SA等防御激素处理下显著响应，表明*DaWRKY*基因家族在参薯应对生物与非生物胁迫中发挥重要作用。

关键词： 参薯；*WRKY*基因家族；转录因子；线虫胁迫；激素诱导；基因表达
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1287

Role of the *WRKY* Gene Family in *Dioscorea alata* L. in Response to Nematode Stress Response and Hormonal Signal Regulation

WANG Ming-zhu[1#] SUN Lin-tao[1#] CHANG Ying-ying[1] ZHANG Jiang-li[1] GAO Jin[1, 2*] WANG Rui-fei[1, 2]
ZHANG Hao[1, 2] LI Ming-jun[1] YANG Qing-xiang[1, 2*]
(1. *College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang* 453007; 2. *Henan International Joint Laboratory of Agricultural Microbial Ecology and Technology, Xinxiang* 453007)

Abstract:【Objective】Systematic identification and characterization of *WRKY* gene family members in greater yam (*Dioscorea alata*) were performed to establish a foundation for subsequent research on their functions in response to root-knot nematode stress.【Method】Based on the whole-genome data of *Dioscorea alata*, we conducted a genome-wide identification of the *DaWRKY* gene family using bioinformatics methods. The analyses included physicochemical properties of the encoded proteins, phylogenetic relationships, gene structures, chromosomal locations, and promoter *cis*-acting elements. The expression patterns of the *DaWRKY* gene were analyzed using a combined approach of transcriptome data and RT-qPCR experiments across various tissues, under *Meloidogyne incognita* stress, and in response to treatments with plant hormones (ABA, MeJA, and SA).【Result】A total of 70 *DaWRKY* genes were identified in *D. alata*. The encoded proteins, ranging from 127 to 651 amino

收稿日期： 2025-11-26
基金项目： 国家重点研发计划专项（2023YFD1600600），河南省科技攻关项目（242102111103），国家自然科学基金项目（32401933）
*通信作者： 高锦 gaojin@htu.edu.cn，杨清香 yangqx@htu.edu.cn
#同等贡献

acids in length, were all predicted to be hydrophilic and localized to the nucleus. Phylogenetic analysis classified them into three groups (I, II, and III), with group II being the largest proportion (65.71%). Chromosomal location analysis revealed that these genes were unevenly distributed across 15 chromosomes. Expression profile analysis indicated that *DaWRKY* genes were significantly enriched in roots and microtubers. Under *M. incognita* stress, eight *DaWRKY* genes were up-regulated at 7 d post-infection, among which *DaWRKY2* exhibited the highest fold change in up-regulation. During ABA treatment, only *DaWRKY33* was down-regulated from 1 to 5 d, while *DaWRKY26* showed the most significant up-regulation. JA treatment induced an initial decrease followed by an increase in the expression of *DaWRKY33* and *DaWRKY69*, and eight genes were all up-regulated at 12 h post-treatment. Under SA treatment, all genes except *DaWRKY16* were up-regulated at 12 h. 【Conclusion】 A total of 70 *DaWRKY* transcription factors were identified in *D. alata*. Among them, members such as *DaWRKY2*, *DaWRKY33*, and *DaWRKY46* showed significant responses to root-knot nematode infection as well as treatment with defense-related hormones including ABA, JA, and SA. These results indicate that the *DaWRKY* gene family plays crucial roles in the response of *D. alata* to biotic and abiotic stresses, providing a foundation for elucidating the stress resistance mechanisms of this crop.

Keywords: *Dioscorea alata*; *WRKY* gene family; transcription factor; nematode stress; hormone induction; gene expression

参薯（*Dioscorea alata*）又名云饼山药、脚板薯、大薯，是薯蓣科（Dioscoreaceace）薯蓣属（*Dioscorea*）的缠绕草质藤本植物，广布于全球热带和温带地区，是药食同源的大宗作物[1]。参薯块茎营养丰富，除作为优质碳水化合物来源为机体提供能量外，还含有人体必需氨基酸，有助于组织修复以及酶与激素的合成；其富含的膳食纤维能促肠道蠕动、调节肠道微生态并降低心血管病风险[2]。在中医药理论中，参薯具有健脾止泻、益肺滋肾等功效；现代研究发现其所含的薯蓣皂苷等活性成分具有抗氧化、抗炎及抗肿瘤等多种药理活性，其多糖类物质也被证实具有免疫调节功能[3]。

转录因子（transcription factors, TFs）是一类能够特异性结合基因启动子区顺式作用元件的DNA结合蛋白，通过激活或抑制靶基因的转录，在生命活动中发挥核心调控作用。目前在植物中已鉴定出多个重要的转录因子家族，如bZIP、bHLH、MYB和WRKY等，它们被广泛证实参与植物的次生代谢、生长发育以及对环境胁迫的响应过程[4]。其中，WRKY是高等植物中最大的转录因子家族之一，其特征性结构包括N端高度保守的WRKYGQK七肽和C端约60个氨基酸的锌指基序，二者决定了该转录因子与靶基因启动子结合的特异性和能力[5]。根据WRKY保守结构域的数量和锌指结构的类型，*WRKY*转录因子家族主要分为3个亚家族：Group I含有两个WRKY结构域，其C端为C2H2型锌指；Group II只含一个WRKY结构域，锌指类型同样为C2H2型，该组可进一步分为5个亚组，且成员数量最多；Group III也含一个WRKY结构域，但其锌指为C2HC型，这类成员多参与胁迫响应过程[6]。

*WRKY*基因家族功能多样，主要参与调控植物生长发育、衰老进程以及对非生物和生物胁迫的应答。例如，杨树*PagWRKY33a/b*通过结合*NRG1.1*和*GASA14*的启动子激活转录，既维持对胶孢炭疽菌的抗性，又参与赤霉素（GA）信号传导以降低免疫激活对生长的抑制，其蛋白稳定性受RNF5介导的泛素化调控，平衡杨树免疫与生长[7]。热胁迫下，6-苄氨基嘌呤（6-BA）可减轻黑麦草叶片衰老，伴随*Lp-WRKY69/70*表达上调，其可能通过调控细胞分裂素或乙烯途径增强耐热性[8]。在苹果中过表达*Md-WRKY100*可增强对胶孢炭疽菌的抗性，而RNAi植株则表现出更高感病性[9]。葡萄*VqWRKY52*受SA强烈诱导，其在拟南芥中异源表达可增强对白粉病的抗性，表明其通过SA依赖途径调控防御相关细胞死亡[10]。此外，多项研究表明*WRKY*基因也参与了植物与根结线虫的相互作用。过表达番茄*SlWRKY45*会显著增加线虫侵染数量，发挥负调控作用，而*Sl-WRKY3*过表达会导致根结线虫侵染率降低，起正调控作用[11-12]。黄瓜*CmWRKY*基因的差异表达也与线虫抗性有关[13]。

参薯作为药食同源作物，其*WRKY*转录因子在线虫胁迫响应及激素信号调控中的作用尚未系统解析。本研究系统鉴定参薯*DaWRKY*基因家族成员，分析其组织特异性表达模式，重点解析对线虫胁迫以及脱落酸（ABA）、茉莉酸甲酯（MeJA）和水杨酸（SA）等激素处理的响应特征，为进一步揭示

*WRKY*转录因子在参薯抗线虫胁迫及激素应答相互调控中的功能机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料为组织培养瓶中生长的、长势一致且健康的参薯组培苗，培养条件为16 h光照、8 h黑暗，光照强度为125 μmol/(m^2·s)，温度26 ℃，相对湿度75%。

1.2 方法

1.2.1 基因数据来源 从拟南芥信息资源中心数据库TAIR（https://www.arabidopsis.org/）和水稻基因组注释项目RGAP（https://rice.uga.edu/）获取拟南芥和水稻全基因组测序及注释文件。从山药组学网站YamOmics（https://biotec.njau.edu.cn/yamdb/）获取参薯（*D. alata*，公布号：GCA_020875875.1）与几内亚山药（*D. rotundata*，公布号：GCF_009730915.1）的全基因组数据及其完整注释信息[14]。

1.2.2 基因家族的筛选鉴定及蛋白质理化性质分析 根据WRKY家族ID号（PF03106）在数据库Pfam（https://pfam.xfam.org/）中检索WRKY隐马尔可夫模型文件（HMM）。以WRKY结构域为模板序列，通过HMMER筛选出山药含有WRKY结构域的预测蛋白，其阈值为E-value<10^{-20}。用HMMER 3.0的hmmbuild功能将筛选的预测蛋白构建为一个山药特异的HMM文件[15]。利用NCBI的保守结构域数据库（CDD）[16]与Pfam数据库对上述结果进行验证，其中E值<10^{-10}，且序列包含完整的WRKY结构域，由此确定*DaWRKY*基因家族成员。通过ExPASy（https://web. expasy. org/protparam/）中的ProtParam tool工具对最终得到的*DaWRKY*基因家族成员的蛋白序列进行理化性质预测，包括氨基酸序列长度、理论分子量、等电点、消光系数、不稳定指数及脂肪族氨基酸指数等，为后续基因功能研究提供基础数据支撑。亚细胞定位预测先通过Cell-PLoc 2.0的Plant-mPLoc（http://www. csbio. sjtu. edu. cn/bioinf/cell-ploc-2/）模块进行多序列批量预测，获得初步分布趋势，再运用DeepLoc 2.1（https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepLoc-2.1/）进行二次验证。

1.2.3 系统发育分析 通过PhyloSuite v1.2.3软件[17]将拟南芥WRKY蛋白序列与参薯中获取的*WRKY*基因家族一同构建系统发育树。先使用MAFFT进行序列比对并修剪，将结果导入ModelFinder以筛选最优模型，系统发育树采用MrBayes v3.2.7a软件构建[18]。根据BIC准则，最佳模型为：JTT+G4。同时参照拟南芥分类方法，用ChiPlot（https://www.chiplot.online/）可视化[19]。

1.2.4 染色体定位、共线性和选择压力分析 从*D. alata*的注释文件中检索染色体位置。根据鉴定出的*DaWRKY*转录因子家族信息和基因组注释文件，并利用TBtools v2.152中的Gene location visualize from GTF/GFF功能进行染色体位置的可视化定位分析[20]。使用TBtools中的MCScanX功能分析参薯与拟南芥（*A. thaliana*）、几内亚山药（*D. rotundata*）和水稻（*O. sativa*）WRKY蛋白之间的共线性。Dual Synteny Plotter软件（https://github. com/CJ-Chen/TBtools）用于计算候选同源基因对的同义（K_s）和非同义（K_a）替换率。

1.2.5 基因结构、保守结构域与基序组成分析 通过在线生信工具MEME（https://memesuite. org/meme/tools/meme）预测*DaWRKY*家族Motif数量及分布情况[21]，进一步挖掘*DaWRKY*特征的Motif序列，基序参数设定为10，其余默认值。利用TBtools软件的GFF Parser功能模块从参薯基因组注释文件中提取*DaWRKY*家族基因的外显子和内含子等基因结构信息。同时，利用NCBI中的Batch CD-Search对*DaWRKY*家族成员蛋白序列进行保守结构域分析。并用TBtools中内置工具Gene Structure Shower对*DaWRKY*家族进行基因结构分析结果可视化。

1.2.6 启动子顺式作用元件分析 从参薯的全基因组数据库中提取*DaWRKY*基因家族成员5′端上游2 000 bp的序列作为候选启动子序列，使用PlantCARE（http://bioinformatics. psb. ugent. be/webtools/plantcare/html/）分析启动子中的顺式作用元件，对筛选后的顺式作用元件进行注释，并结合进化树利用TBtools进行可视化绘图[22]。

1.2.7 *DaWRKY*基因在不同组织中的表达分析 从山药组学平台YamOmics中提取*DaWRKY*基因的表达量信息，并对该基因在12个组织（包括Leaf-Nonflowering、Leaf-30Day、Leaf-Adult、Stem-Nonflowering、Tuber-Nonflowering、Tuber-Flowering、

Tuber-WhiteFlesh、Tuber-PurpleFlesh、Bulbil-Initiation、Bulbil-Early、Bulbil-Middle及Bulbil-Mature）中的表达水平展开分析，随后运用TBtools软件构建热图，实现对上述表达数据的可视化呈现。

1.2.8　候选基因RT-qPCR验证　将参薯带芽茎段接种于液体生根培养基（MS+6-BA 2.33 mg/L+NAA 0.1 mg/L+PP_{333} 0.2 mg/L+蔗糖30 g/L）中，每15 d更换一次培养基[23]。选取60 d的参薯组培苗根、茎、叶、微型块茎（每瓶组培苗腋芽部位形成的所有微型块茎混合为一个生物学重复）样品，使用植物RNA提取试剂盒（南京诺唯赞生物科技股份有限公司）提取样本总RNA，其浓度通过超微量分光光度计测定。以此RNA为模板进行反转录，获得参薯cDNA。针对所选基因，设计RT-qPCR特异性引物，并委托生物工程（上海）股份有限公司合成，引物序列见附表1。反应体系为10 μL，程序为：95 ℃ 3 min；95 ℃ 30 s，58 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，40个循环。每样品设4个生物学重复，利用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算基因相对表达量。

1.2.9　*DaWRKY*基因在线虫和激素处理下的表达分析　为分析*DaWRKY*基因的表达模式，分别设置了线虫侵染与激素处理实验，所用参薯组培苗均培养60 d后进行处理。从受南方根结线虫侵染的番茄根系分离虫卵[24]，孵化后获得二龄幼虫（J2）。经无菌水反复洗涤并收集、制备线虫悬液。每株参薯组培苗接种1 500条J2幼虫，分别于接种后0、1、3、5和7 d采集根部样品，以覆盖线虫侵入、诱导取食位点（巨细胞初始形成）形成与发育，以及寄生关系建立等关键阶段[25-27]。采用喷雾法将100 μmol/L的ABA、MeJA和SA溶液分别均匀喷施于叶片正反面，直至叶面完全湿润、液滴开始汇聚下滴为止，分别于处理后0、1、4、12 h采集根部样品[28]。上述每个处理组均包含3个生物学重复，具体实验方法同1.2.8。

2　结果

2.1　*DaWRKY*基因家族的鉴定及基本理化性质分析

从NCBI检索参薯蛋白数据，经Pfam-HMMER保守序列筛选、SMART保守结构域预测去除假阳性，鉴定出70个含典型WRKY结构域的参薯转录因子，命名为*DaWRKY1*–*DaWRKY70*（附表2）。理化性质分析结果显示：氨基酸数127–651，相对分子质量14 693.43–76 946.07 Da，等电点4.79–10.3（含酸性及碱性蛋白）；脂肪族指数40.15–75.85，多数DaWRKY蛋白较稳定（>55）；平均亲水性-1.226–-0.39，均为亲水蛋白；仅55个蛋白不稳定系数<40，稳定蛋白占比为7.14%。蛋白质二级结构预测显示，包含α-螺旋、β-转角和无规则卷曲这3种结构，以无规则卷曲为主，其次是α-螺旋，β-转角占比较小。亚细胞定位预测显示70个WRKY蛋白全部位于细胞核（nucleus），这与多数植物中的预测结果相似。

2.2　*DaWRKY*基因家族系统进化分析

为进一步了解参薯中*WRKY*基因的进化关系，将其与模式植物拟南芥的WRKY家族进行了系统发育比较分析（图1）。70个*DaWRKY*分为3个组（I、II和III）。I组最少，包含11个*DaWRKY*基因；II组包含的*DaWRKY*基因最多，有46个；III组包含13个*DaWRKY*基因。II组进一步分为IIa、IIb、IIc、IId和IIe亚组，分别由5、7、16、10和8个*DaWRKY*基因组成。IIa和IIb、IId和IIe在系统发育树上分布较近，IIc的分布较接近III组，表明两亚组的进化关系较近。

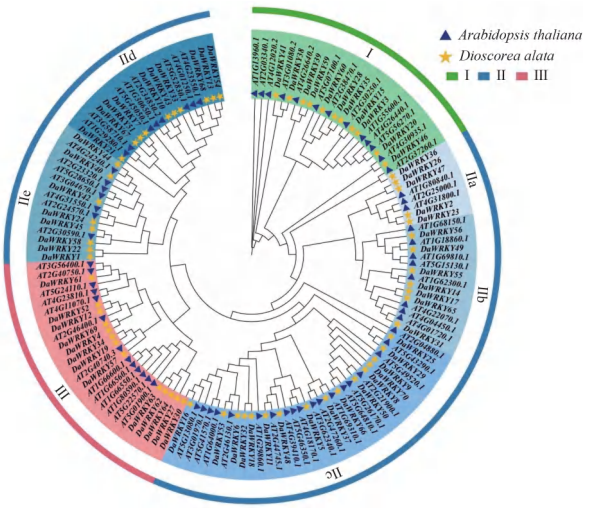


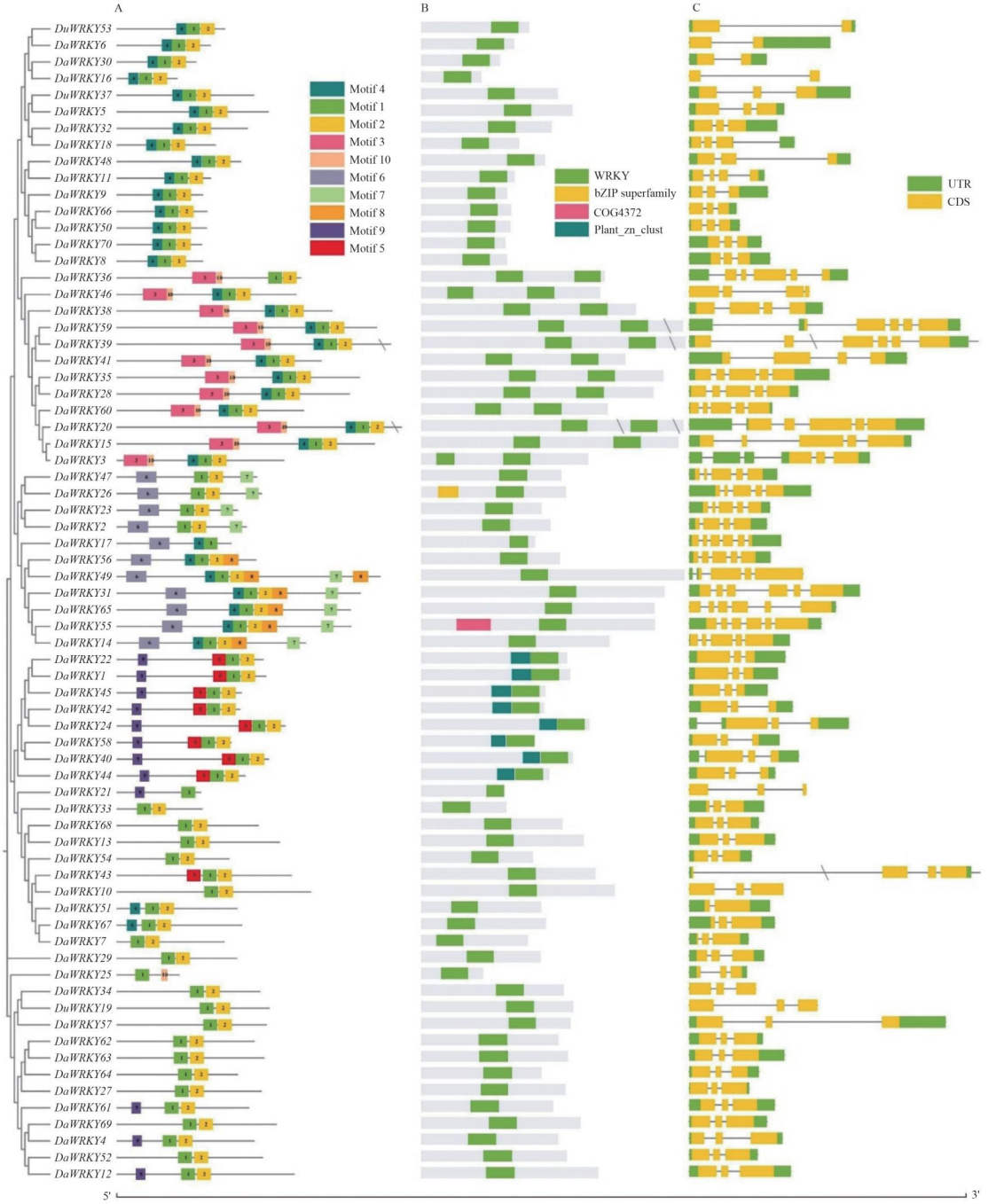
图1　参薯与拟南芥*WRKY*基因家族系统进化树

Fig. 1　Phylogenetic tree of *WRKY* gene family in *D. alata* and *A. thaliana*

2.3　*DaWRKY*基因家族蛋白保守基序及结构域分析

对鉴定出的70个*WRKY*基因家族成员进行Motif

分析，共筛选出10种保守蛋白基序（图2-A），每个成员包含2–6个基序。各成员所含Motif种类存在差异，其中Motif 1存在于所有蛋白中，而除*DaWRKY17*和*DaWRKY25*外，其余成员均含有Motif 2。



为便于排版，对较长的基因进行了部分截断（用\表示），示意图中只展示基序、结构域、CDS区的相对位置，不代表它们在基因或蛋白上所处的绝对位置

For typesetting purposes, longer genes have been partially truncated (indicated by \). The schematic diagram only shows the relative positions of motifs, domains, and CDS regions, and does not indicate their absolute locations in the gene or protein

图2 *DaWRKY*的基序分布（A）、保守结构域（B）及基因结构分析（C）

Fig. 2 Motif distribution (A), conserved domain (B), and gene structure (C) analysis of *DaWRKY*

部分基序表现出明显的组别特异性分布：Motif 3仅存在于第I组，Motif 6仅分布于IIa和IIb亚组，而Motif 5和Motif 9则几乎仅见于IIe亚组。总体而言，同一组内成员的保守基序组成相似，提示DaWRKY蛋白在功能上可能具有保守性。

DaWRKY蛋白的保守结构域分析结果显示（图2-B），所有70个成员均含有WRKY结构域。其中，8个成员（均属于IIe亚组）额外含有WRKY或植物锌簇结构域。*DaWRKY26*（IIb亚组）包含b-ZIP超家族结构域，而*DaWRKY55*则含有COG-4372结构域。

进一步分析*DaWRKY*基因结构（图2-C），结果显示，70个*DaWRKY*基因中有5个（*DaWRKY10*、*DaWRKY16*、*DaWRKY19*、*DaWRKY21*和*DaWRKY46*）不含非翻译区（UTR）。上述结构特征表明，*WRKY*基因家族可能已从功能相对冗余的基本单元，演化形成具备功能分化与协同调控能力的复杂网络，从而增强细胞在多变环境中的适应性及其生命活动的调控能力。

2.4　*DaWRKY*基因启动子顺式作用元件分析

*DaWRKY*基因上游2 000 bp启动子区域的顺式作用元件预测结果显示，*DaWRKY*启动子区包含多种与激素应答、胁迫响应及生长发育相关的顺式作用元件（图3）。在70个*DaWRKY*基因的启动子中，共鉴定出胁迫响应元件1 129个、激素响应元件799个、MYB干旱/高盐/低温响应元件603个以及光响应元件723个。其中，64个*DaWRKY*基因启动子中含有238个G-box元件，58个基因启动子中含有236个脱落酸响应元件（ABRE），51个基因启动子中含有118个乙烯响应元件（ERE），55个基因启动子中含有136个茉莉酸甲酯响应元件（CGTCA-motif/TGACG-motif）。推测*DaWRKY*基因在参薯激素调控、生长发育和逆境胁迫中发挥着重要作用。

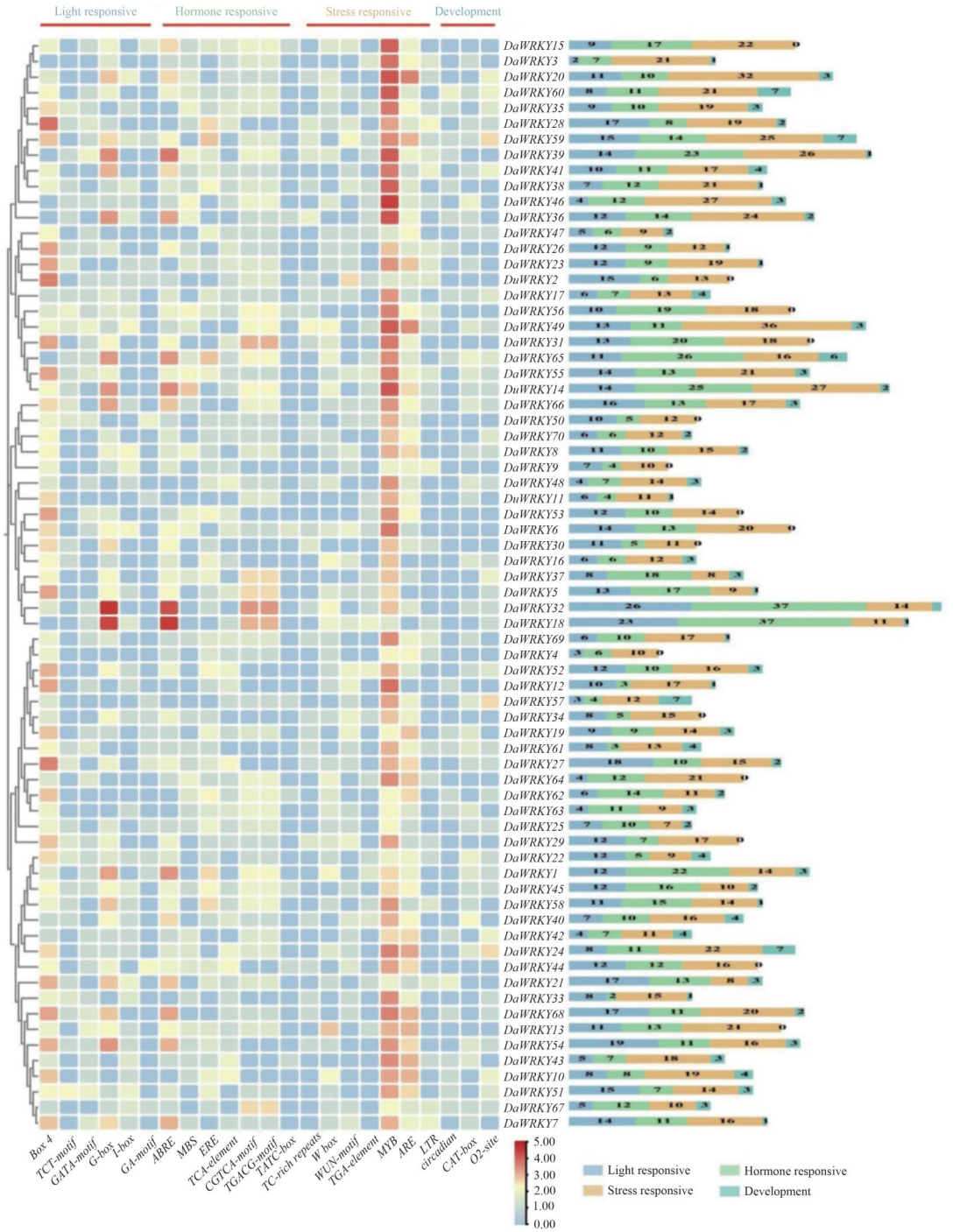
2.5　染色体定位和共线性分析

在参薯的20条染色体中，*DaWRKY*基因不均匀地分布于15条染色体上（Chr03、Chr04、Chr05、Chr07、Chr08、Chr09、Chr10、Chr12、Chr13、Chr15、Chr16、Chr17、Chr18、Chr19和Chr20）（图4-A）。其中，Chr04和Chr17上分布的基因数量最多，各有8个；Chr19次之，分布有7个*WRKY*基因；Chr08、Chr12和Chr20则各含有6个*WRKY*基因，显示出明显的基因成簇现象，可能反映该区域在进化过程中发生过基因重复事件或具有重要功能。Chr10上仅定位有1个*WRKY*基因（*DaWRKY30*），而Chr01、Chr02、Chr06、Chr11和Chr14上未发现*WRKY*基因分布，其余染色体上各含有2–5个*DaWRKY*基因。值得注意的是，*DaWRKY*基因多集中分布于染色体末端区域，其在染色体上的广泛分布凸显了*WRKY*基因家族在参薯进化过程中的重要性及潜在功能多样性。此外，共鉴定出6对串联重复基因，分别位于Chr04（2对）、Chr12（1对）、Chr13（1对）和Chr17（2对）。

为探究*WRKY*基因家族的进化保守性，利用MCSCANX软件进行了共线性分析。种内共线性分析识别出30对片段重复基因（图4-B），这些基因对均属于同一亚组，提示其可能源自染色体片段的复制事件，且在进化过程中未发生明显功能分化，或存在功能冗余。进一步的种间共线性分析表明，参薯（*D. alata*）与几内亚山药（*D. rotundata*）、水稻（*O. sativa*）及拟南芥（*A. thaliana*）之间分别存在93、92和46对共线性*WRKY*基因（图5）。为深入解析*DaWRKY*基因的进化机制，本研究计算了其非同义替换率（*Ka*）、同义替换率（*Ks*）及*Ka*/*Ks*比值（附表3）。结果显示，*DaWRKY*基因的*Ka*/*Ks*比值均显著小于1，表明该基因家族在进化过程中主要受到纯化选择作用。

2.6　*DaWRKY*基因家族在不同组织和生长发育中的热图分析

为明确70个*DaWRKY*基因在参薯不同发育阶段的表达模式，我们从公共数据库中获取了12个组织的转录组数据，包括非开花期叶、30日龄叶片、成熟叶片、非开花期茎、非开花期块茎、开花期块茎、白色块茎、紫色块茎、膨大前期珠芽、膨大早期珠芽、膨大中期珠芽以及成熟期珠芽。70个*DaWRKY*基因在不同组织中呈现特异性表达（附图1），反映出该基因家族在参薯中可能具有功能多样性。所有*DaWRKY*基因可被划分为若干表达簇，其中52个基因在全部12个组织中均有表达。*DaWRKY1*、*DaWRKY41*、*DaWRKY46*、*DaWRKY45*和*DaWRKY22*在所有组织中表达水平相对较高。整体来看，*DaWRKY*基因在块茎和珠芽中表达较为显著，表明*WRKY*基因可能在这两类组织中发挥更为重要的调控作用。

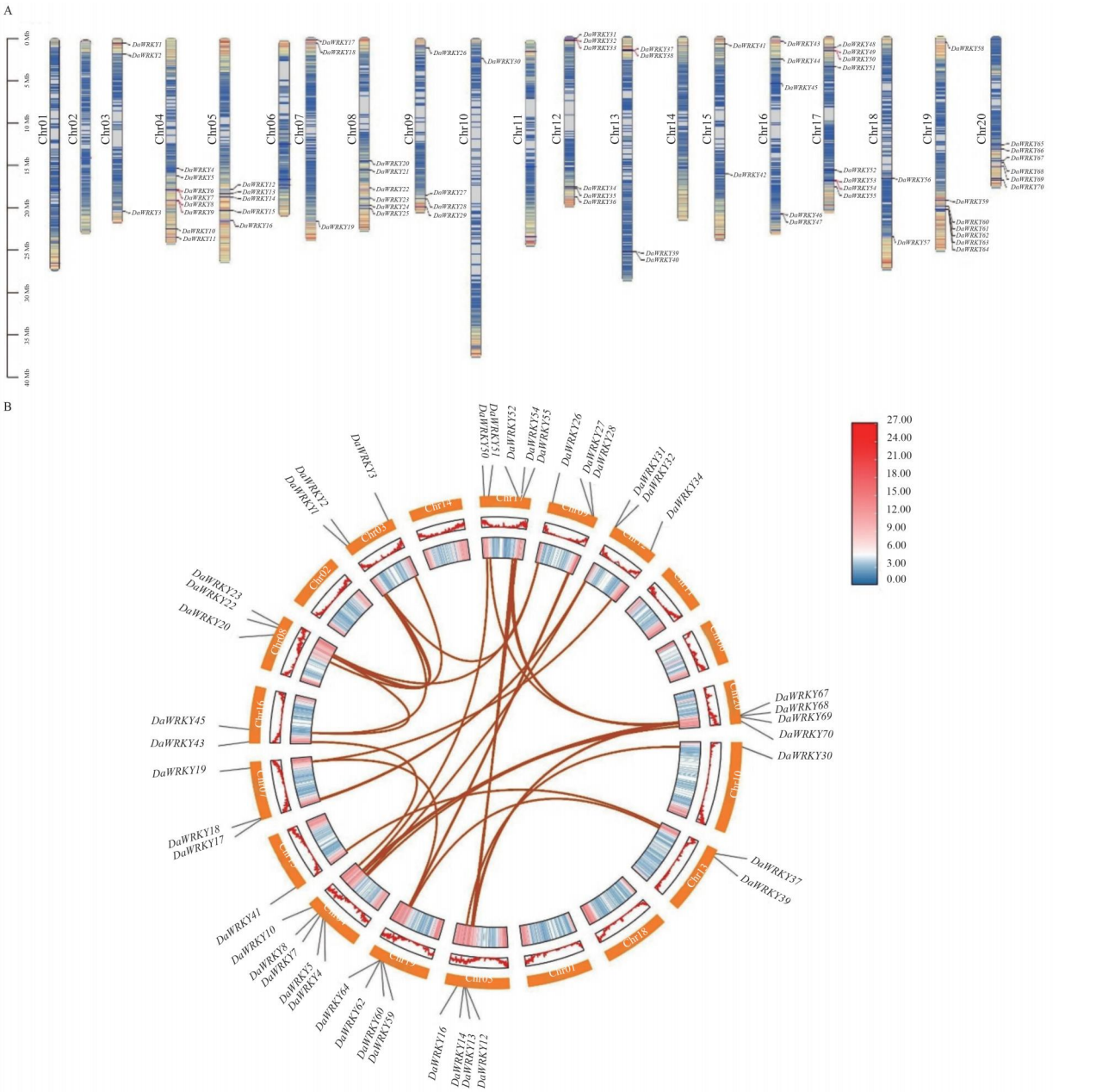


中间面板是显示顺式作用元件富集水平的热图。右边的堆积图显示了顺式作用元件的丰度：蓝色矩形表示光响应顺式作用元件；绿色矩形表示激素响应顺式元件；黄色矩形表示胁迫响应的顺式元件；青色矩形表示与生长和发育相关的顺式元件

The central panel is a heatmap displaying the enrichment levels of *cis*-acting elements. The stacked bar chart on the right illustrates the abundance of *cis*-acting elements: blue rectangles represent light-responsive *cis*-acting elements; green rectangles, hormone-responsive *cis*-elements; yellow rectangles, stress-responsive *cis*-elements; while cyan rectangles denote *cis*-elements associated with growth and development

图3 *DaWRKY*基因顺式作用元件分析

Fig. 3 Analysis of the *cis*-acting elements of the *DaWRKY* gene



A：彩色矩形条表示*D. alata*的染色体；Chr1–20表示对应的染色体；红色粗轮廓表示基因串联重复，0–40 Mb的刻度表示染色体长度。B：红色线条表示片段重复，通过红色线条连接的两个基因是同源的。基因密度由热图（内圈）表示，外圈显示染色体的长度，最外圈的黑色线段表示基因在染色体上的定位

A: Colored rectangular bars represent the chromosomes of *D. alata*; Chr1–20 indicate the corresponding chromosomes; the red thick outlines indicate gene tandem duplications, and the scale bar of 0–40 Mb represents the chromosome length. B: Red lines indicate segmental duplications, and the two genes connected by red lines are homologous. Gene density is represented by heatmap (inner circle), the outer circle shows the chromosome length, and the black line segments on the outermost circle indicate the gene locations on the chromosomes

图4　参薯*DaWRKY*基因家族的染色体位置（A）和共线性分析（B）

Fig. 4　Chromosomal location (A) and collinearity analysis (B) of *DaWRKY* gene family in *D. alata*

2.7　*DaWRKY*基因家族的表达特性分析

2.7.1　组织表达特异性分析　基于拟南芥、水稻、玉米、番茄等模式植物中已知参与抗病、生物胁迫及激素信号通路相关的WRKY蛋白序列[29–33]，通过同



图5 参薯(*D. alata*)、几内亚山药(*D. rotundata*)、水稻(*O. sativa*)和拟南芥(*A. thaliana*)*WRKY*基因的共线性分析

Fig. 5 The collinearity analysis of *WRKY* genes in *D. alata*, *D. rotundata*, *O. sativa*, and *A. thaliana*

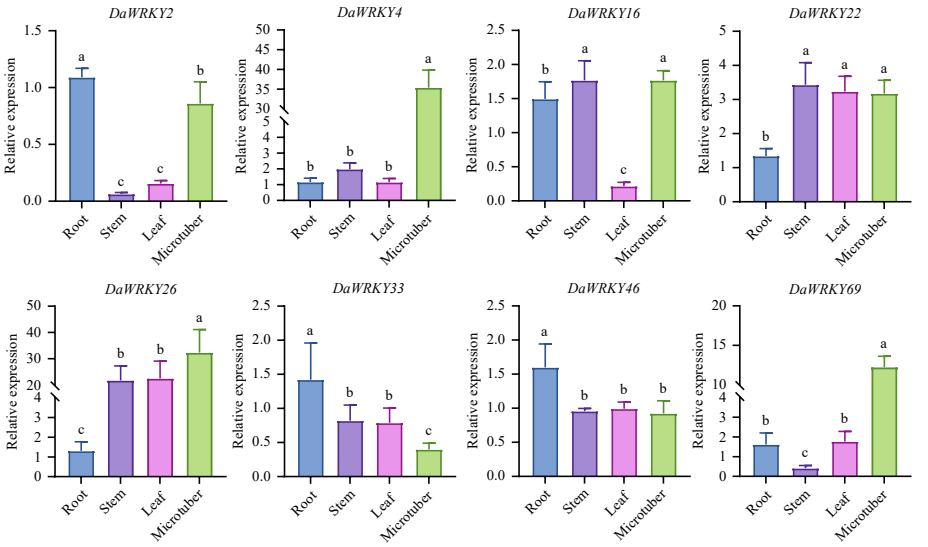
源比对与系统分析，并结合参薯*WRKY*基因家族的组织表达模式，最终筛选出8个参薯*WRKY*基因家族成员，分别为*DaWRKY2*、*DaWRKY4*、*DaWRKY16*、*DaWRKY22*、*DaWRKY26*、*DaWRKY33*、*DaWRKY46*和*DaWRKY69*，通过RT-qPCR检测其在根、茎、叶和微型块茎中的表达水平（图6）。结果显示，继代培养60 d的组培苗中，不同*DaWRKY*基因的表达具有明显的组织特异性。*DaWRKY2*在根中的表达水平最高，显著高于其他组织，其表达量依次为根>微型块茎>叶>茎。*DaWRKY33*和*DaWRKY46*同样在根中表达量最高。*DaWRKY4*、*DaWRKY26*和*DaWRKY69*在微型块茎中表达最为显著。茎中表达最高的是*DaWRKY16*和*DaWRKY22*，而表达最低的是*DaWRKY2*和*DaWRKY69*。此外，*DaWRKY22*和*DaWRKY26*在根中表达量最低，*DaWRKY16*则在叶片中表达量最低。

2.7.2 线虫胁迫下的表达模式分析 RT-qPCR分析结果显示，在根结线虫胁迫下，*DaWRKY33*的表达量呈现先下降后显著上升的趋势；*DaWRKY4*在胁迫3 d时显著上升，5 d时下降，7 d时再次显著上调；*DaWRKY16*在7 d时表达量有所下降；其余5个基因均在5 d时显著上升，并于7 d时持续上调（图7）。

2.7.3 激素处理下的相对表达分析 在ABA处理下，*DaWRKY33*的表达量在整个处理期间显著降低；*DaWRKY46*在1 h显著升高，4 h下降，12 h再次显著上升；*DaWRKY16*、*DaWRKY22*和*DaWRKY69*均在12 h时显著上升；*DaWRKY2*和*DaWRKY26*的表达量随处理时间显著上升（图8-A）。MeJA处理结果显示，*DaWRKY22*、*DaWRKY33*和*DaWRKY69*的表达量呈现先下降后上升的趋势，12 h时达到峰值；*DaWRKY26*在整个过程中显著上调；其余4个基因在12 h均显著上调（图8-B）。SA处理结果显示，*DaWRKY2*、*DaWRKY26*和*DaWRKY69*在1 h显著上调，4 h下降，12 h再次上升，整体呈显著上调趋势；*DaWRKY4*和*DaWRKY33*为先下降后上升，12 h时达到最高表达水平；*DaWRKY16*表达量先下降后略有回升，但整体趋于下降；*DaWRKY22*和*DaWRKY46*在12 h表达量显著上调（图8-C）。

3 讨论

参薯共鉴定出70个WRKY家族基因，高于同属山药（25个）[34]、菊叶薯蓣（21个）[35]、盾叶薯蓣（27个）[36]，但低于甘薯（泰中6号）（84个）[37]、绣球（84个）[38]、枇杷（100个）[39]、红花（87个）[40]。可见，薯蓣属植物间WRKY家族基因数目存在显著差异，这种数目变异可能与其功能多样化相关。



不同小写字母表示组间存在显著差异(P<0.05)，下同

Different lowercase letters indicate significant differences among groups (P<0.05). The same below

图6　*DaWRKY*基因在不同组织中的相对表达量

Fig. 6　Relative expression of *DaWRKY* in different tissues

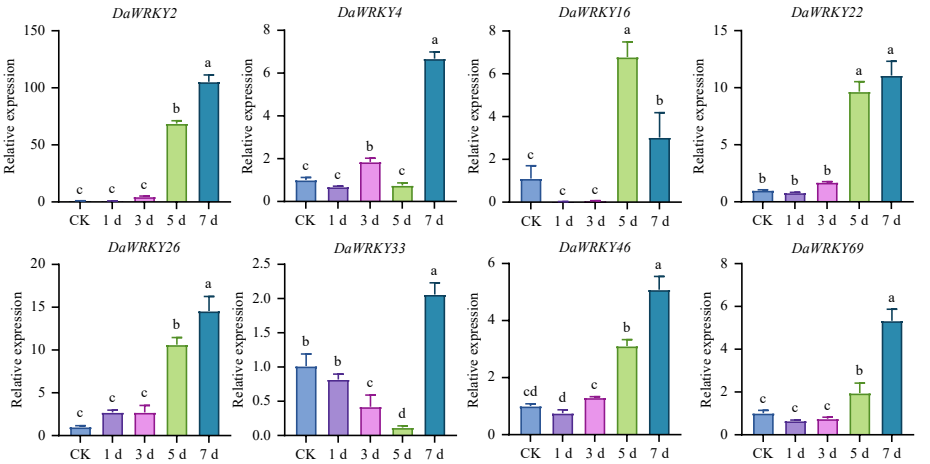
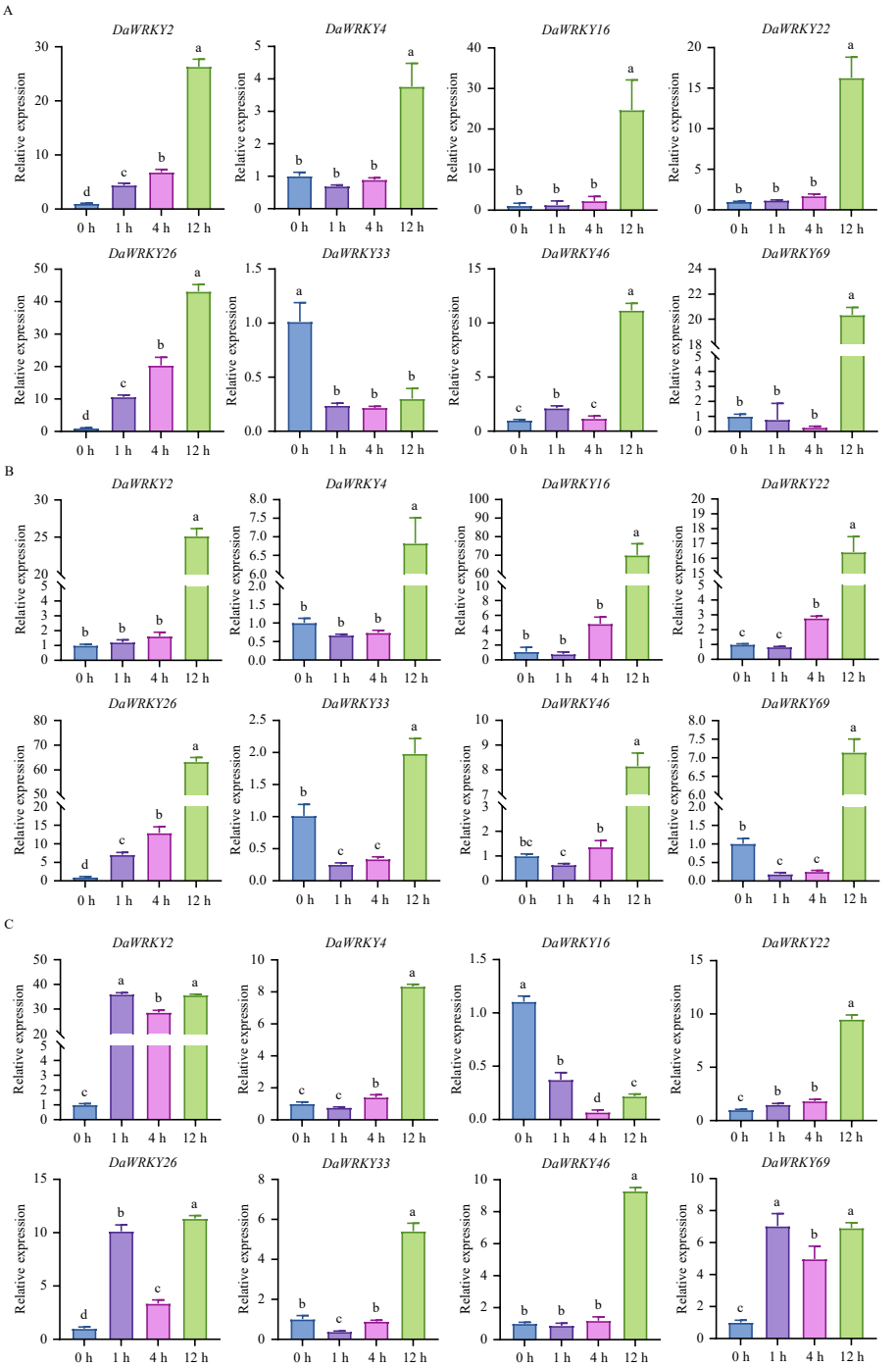


图7　*DaWRKY*基因在接种南方根结线虫不同时期的相对表达量

Fig. 7　Relative expression of *DaWRKY* genes at different stages after *M. incognita* inoculation

基于参薯WRKY成员的鉴定，进行系统发育关系、启动子顺式作用元件、共线性等生物信息学分析，为揭示WRKY家族的进化动态和功能多样性奠定了基础。系统发育分析将*DaWRKY*基因家族分为I组、II组（含5个亚组）和III组，各组成员占比分别为15.7%、65.7%和18.6%，与多数作物分类结果一致[29]。值得注意的是，II组在参薯中占比超过总数的一半，而拟南芥中该组比例仅为40%[41]。推测II组基因在参薯进化过程中可能经历了更多的基因复制。70个*DaWRKY*均鉴定到胁迫、激素和光响应元件，与前人结果一致，表明其表达可能受上述因素调控[42]。此外，多数*DaWRKY*基因的启动子都含有生长相关元件，表明其可能参与植物生长发育等过程。MYB是植物中成员最多的转录调节因子家族之一，例如茄子*SmMYB13*被证实是干旱胁迫的正调控因子[43]。同时发现603个MYB干旱、高盐、



A：ABA处理；B：MeJA处理；C：SA处理

A: Treatment with ABA. B: Treatment with MeJA. C: Treatment with SA

图8 *DaWRKY*基因在不同激素处理下不同时间的相对表达量

Fig. 8 Relative expression of the *DaWRKY* gene at different time under various hormonal treatments

低温响应元件，推测*DaWRKY*与MYB在干旱胁迫及其他逆境响应中可能存在互作机制。*DaWRKY*基因染色体定位显示分布不均，Chr04和Chr17最多（各8个），Chr10仅有1个，5条染色体上未分布任何基

因，且集中于两端。该分布与水稻减数分裂中同源染色体配对始于末端的研究一致[44]，这为上述分布特征提供了可能的理论解释。共线性分析显示，参薯与几内亚山药共有93对共线性基因，提示薯蓣属内WRKY进化较为保守；参薯与水稻（92对）的共线性基因数量多于拟南芥（46对），反映出单子叶植物间进化关系更近，WRKY家族在单子叶与双子叶植物分化后发生了功能分化。此外，共鉴定到6对串联重复和30对片段重复，表明片段重复事件在*DaWRKY*基因演化中起到关键作用，这与大白菜的研究结果一致[45]。

根结线虫主要在根部侵染，分析*DaWRKY*基因在不同组织中的表达模式，有助于从全株系统调控的角度解析参薯对线虫的抗性机制。表达谱分析表明，*DaWRKY*基因在块茎和珠芽中表达较高，且存在组织特异性，这与盾叶薯蓣*DzWRKY*在叶片低表达的模式不同[36]。不同组织RT-qPCR检测结果显示，*DaWRKY*的高表达主要存在于根和贮藏器官中。值得关注的是，*DaWRKY2/33/46*在根中高表达，并且在南方根结线虫侵染条件下，*DaWRKY2/46*表达量均在接种后5、7 d上调，其中*DaWRKY2*表达增幅最高，表明它们可能在根部防御反应中发挥关键作用。而*DaWRKY33*呈现先下降后上升的趋势，说明上述基因共同参与了参薯对根结线虫侵染的应答过程。在微型块茎中表达较高的*DaWRKY4/26/69*也能在线虫胁迫5–7 d强烈诱导下上调。比较不同物种中*WRKY*基因的响应模式发现，甘薯*IbWRKY20*和*IbWRKY40*受茎腐病胁迫诱导而上调，而*IbWRKY6*、*IbWRKY84*则表达下调[37]，反映出不同病原胁迫下WRKY响应模式的差异。

线虫侵染会激活植物的防御反应，并引发ABA、JA、SA等防御激素水平的变化[46–47]，因此，研究*WRKY*转录因子对这些激素的应答表达，有助于解析植物抗线虫的分子机制。外源ABA处理中，除引起*DaWRKY33*表达量显著下调外，其余基因均显著上调，其中*DaWRKY26*表达量最高。在线虫侵染下，*DaWRKY33*在接种后1–5 d表达持续下调，推测线虫侵染通过激活宿主ABA合成或信号转导，从而类似外源ABA处理抑制其转录。这一响应模式与山药中*DoWRKY33*在ABA处理后12 h内显著上调的结果不同[34]，揭示了参薯对ABA的特异性响应机制，为利用ABA精准调控抗线虫胁迫提供分子依据。MeJA处理下，2个基因呈现“先降后升”的表达模式，与山药*DoWRKY69*相似[34]；另有7个基因在12 h均显著上调，显示出MeJA短期高效启动防御基因的特征，这与线虫侵染初期的快速防御需求相对应。此外，番茄中*SlWRKY45*可通过与JA信号抑制子JAZ互作负向调节对根结线虫的抗性，敲除可显著降低根结指数[46]，SlWRKY30IIc与茉莉素通过多层级的互作与反馈，共同精细调控植物对根结线虫的抗性[33]。这些基因可能通过JA信号通路在线虫侵染早期抑制取食或促进组织修复，为MeJA在参薯中短期抗线虫的时序调控提供分子依据。SA处理则诱导正调控因子（*DaWRKY2/26/69/4/33/22/46*）与负调控因子（*DaWRKY16*）协同，既保障防御强度，又避免过度应激，维持参薯“抗病–生长”的平衡。其中*DaWRKY2*在SA处理1 h内显著上调，并在12 h内持续高表达，与其在线虫侵染中高表达的结果一致，说明其可能作为SA通路的关键因子，介导对线虫的早期识别与基础防御。类似机制在其他作物中也有报道：番茄*SlWRKY70*受SA诱导并响应虫害[12]，油菜*BnaWRKY75*可通过激活SA合成基因增强抗病性[47]。此外，*DaWRKY16*在茎部的表达较高，而在SA处理下受抑制，可能有助于优化防御信号的传导与资源分配。

本研究在全基因组水平系统鉴定参薯*DaWRKY*基因家族，揭示其基本特征与调控模式，筛选出多个响应根结线虫胁迫及激素时序调控的关键基因。该家族在线虫侵染与激素处理下表达模式复杂，可整合ABA、JA、SA等信号，参与从早期识别、快速防御到系统抗性的多阶段响应，在抗线虫防御网络中起核心调控作用。不同基因在线虫侵染不同阶段执行特异功能，如*DaWRKY33*表达先降后升，多数基因接种7 d内持续上调。后续可通过功能验证解析其调控网络，为阐明块茎作物抗线虫分子机制及靶向育种提供理论依据。

4　结论

在参薯中系统鉴定出70个*DaWRKY*转录因子，系统发育树分为3个亚群和7个分支。70个*DaWRKY*基因不均匀地分布在15条染色体上，片段复制事件为基因家族扩张的主要方式，启动子均含胁迫、激素、光响应元件及生长相关元件，基因*DaWRKY2*、

DaWRKY22、*DaWRKY26*、*DaWRKY46* 和 *DaWRKY69* 与线虫胁迫及激素信号通路调控相关。

文章所有附图附表请点击链接查看（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260630160610_NewsFile_68.pdf）。

参考文献

[1] 索宁宁, 张艳芳, 高圆丽, 等. 山药块茎膨大期淀粉积累及淀粉合成相关基因表达分析 [J]. 中国瓜菜, 2023, 36(3): 69-76.
Suo NN, Zhang YF, Gao YL, et al. Analysis of starch accumulation and starch synthesis-related gene expression during tuber expansion stage of yam [J]. China Cucurbits Veg, 2023, 36(3): 69-76.

[2] Tareen MBK, Saeed N, Sultan M, et al. Yam as functional food: bioactive properties, health benefits, and applications [J]. Food Nutr Health, 2025, 2: 16.

[3] Ma FY, Wang RJ, Zhang Y, et al. Polysaccharides from *Dioscorea opposita* Thunb.: isolation, structural characterization, and anti-inflammatory and anti-tumor effects against hepatocellular carcinoma [J]. Chem Biol Technol Agric, 2023, 10: 43.

[4] Sukumari Nath V, Kumar Mishra A, Kumar A, et al. Revisiting the role of transcription factors in coordinating the defense response against *Citrus bark* cracking viroid infection in commercial hop (*Humulus lupulus* L.) [J]. Viruses, 2019, 11(5): 419.

[5] Jiang JJ, Ma SH, Ye NH, et al. WRKY transcription factors in plant responses to stresses [J]. J Integr Plant Biol, 2017, 59(2): 86-101.

[6] Khoso MA, Hussain A, Ritonga FN, et al. WRKY transcription factors (TFs): Molecular switches to regulate drought, temperature, and salinity stresses in plants [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 1039329.

[7] Yu XQ, Niu HQ, Zhang YM, et al. Transcription factor PagWRKY33 regulates gibberellin signaling and immune receptor pathways in *Populus* [J]. Plant Physiol, 2024, 197(1): kiae593.

[8] Chen W, Huang BR. Cytokinin or ethylene regulation of heat-induced leaf senescence involving transcriptional modulation of WRKY in perennial ryegrass [J]. Physiol Plant, 2022, 174(5): e13766.

[9] Zhang F, Wang F, Yang S, et al. MdWRKY100 encodes a group I WRKY transcription factor in *Malus domestica* that positively regulates resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* infection [J]. Plant Sci, 2019, 286: 68-77.

[10] Wang XH, Guo RR, Tu MX, et al. Ectopic expression of the wild grape WRKY transcription factor VqWRKY52 in *Arabidopsis thaliana* enhances resistance to the biotrophic pathogen powdery mildew but not to the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 97.

[11] Chinnapandi B, Bucki P, Braun Miyara S. *SlWRKY45*, nematode-responsive tomato *WRKY* gene, enhances susceptibility to the root knot nematode; *M. javanica* infection [J]. Plant Signal Behav, 2017, 12(12): e1356530.

[12] Chinnapandi B, Bucki P, Fitoussi N, et al. Tomato SlWRKY3 acts as a positive regulator for resistance against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by activating lipids and hormone-mediated defense-signaling pathways [J]. Plant Signal Behav, 2019, 14(6): 1601951.

[13] Ling J, Liu R, Hao YL, et al. Comprehensive analysis of the WRKY gene family in *Cucumis metuliferus* and their expression profile in response to an early stage of root knot nematode infection [J]. Front Plant Sci, 2023, 14: 1143171.

[14] Bredeson JV, Lyons JB, Oniyinde IO, et al. Chromosome evolution and the genetic basis of agronomically important traits in greater yam [J]. Nat Commun, 2022, 13: 2001.

[15] Finn RD, Clements J, Eddy SR. HMMER web server: interactive sequence similarity searching [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39 (suppl_2): W29-W37.

[16] Marchler-Bauer A, Bo Y, Han LY, et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D200-D203.

[17] Zhang D, Gao FL, Jakovlić I, et al. PhyloSuite: an integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies [J]. Mol Ecol Resour, 2020, 20(1): 348-355.

[18] Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space [J]. Syst Biol, 2012, 61(3): 539-542.

[19] Wang YP, Tang HB, DeBarry JD, et al. MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(7): e49.

[20] Chen C, Chen H, He Y, et al. TBtools, a toolkit for biologists integrating various biological data handling tools with a user-friendly interface [PP/OL]. BioRxiv, 2018, 289660(10.1101): 289660.

[21] Bailey TL, Boden M, Buske FA, et al. MEME Suite: tools for motif discovery and searching [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(suppl_2): W202-W208.

[22] Lescot M, Déhais P, Thijs G, et al. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30 (1): 325-327.

[23] 陈芝华, 陈木兰, 李丽红, 等. 参薯'明淮1号'组培快繁技术研究 [J]. 云南农业大学学报: 自然科学, 2017, 32(3): 564-569.
Chen ZH, Chen ML, Li LH, et al. Study on rapid propagation technology of tissue culture of *Dioscorea alata* 'minghuai No.1' [J]. J Yunnan Agric Univ Nat Sci, 2017, 32(3): 564-569.

[24] Abd El-Aal EM, Shahen M, Sayed S, et al. *In vivo* and *in vitro* management of *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Heteroderidae) using rhizosphere bacteria, *Pseudomonas* spp. and *Serratia* spp. compared with oxamyl [J]. Saudi J Biol Sci, 2021, 28(9): 4876-4883.

[25] Zhu SR, Estévez JM, Liao HD, et al. The RALF1-FERONIA complex phosphorylates eIF4E1 to promote protein synthesis and polar root hair growth [J]. Mol Plant, 2020, 13(5): 698-716.

[26] 刘锐, 赵建龙, 谢丙炎, 等. 根结线虫诱导的巨型细胞及其形成机制 [J]. 生物技术通报, 2024, 40(3): 62-74.
Liu R, Zhao JL, Xie BY, et al. Giant cells induced by root-knot nematodes and its formation mechanisms [J]. Biotechnol Bull, 2024, 40(3): 62-74.

[27] 陈雪峰, 肖坤, 朱翔, 等. 抗南方根结线虫新疆野生樱桃李巨细胞的发育及*CCS52B*基因的作用 [J]. 园艺学报, 2015, 42(5): 843-852.
Chen XF, Xiao K, Zhu X, et al. Development of giant cells and roles of *CCS52B* gene work in *Meloidogyne incognita* resistant *Prunus sogdiana* [J]. Acta Hortic Sin, 2015, 42(5): 843-852.

[28] Xiong RQ, Peng ZH, Zhou H, et al. Correction: Genome-wide identification, structural characterization and gene expression analysis of the WRKY transcription factor family in pea (*Pisum sativum* L.) [J]. BMC Plant Biol, 2024, 24: 141.

[29] Wu X, Li N, Wang B, et al. Genome-wide identification of *WRKY* gene family and expression analysis of key *WRKY* genes in response to *Fusarium solani* infection in *Lycium barbarum* [J]. Front Plant Sci, 2025, 16: 1543373.

[30] Zheng LL, Qiu BL, Su LL, et al. *Panax notoginseng* WRKY transcription factor 9 is a positive regulator in responding to root rot pathogen *Fusarium solani* [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 930644.

[31] Liu DM, He J, Li Q, et al. A WRKY transcription factor confers broad-spectrum resistance to biotic stresses and yield stability in rice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2025, 122(10): e2411164122.

[32] Wang CT, Ru JN, Liu YW, et al. The maize WRKY transcription factor ZmWRKY40 confers drought resistance in transgenic *Arabidopsis* [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(9): 2580.

[33] Huang H, Ma XC, Sun LL, et al. SlVQ15 recruits SlWRKY30IIc to link with jasmonate pathway in regulating tomato defence against root-knot nematodes [J]. Plant Biotechnol J, 2025, 23(1): 235-249.

[34] Xing LN, Zhang YF, Ge MR, et al. Identification of WRKY gene family in *Dioscorea opposita* Thunb. reveals that *DoWRKY71* enhanced the tolerance to cold and ABA stress [J]. PeerJ, 2024, 12: e17016.

[35] 周建婵. 菊叶薯蓣WRKY转录因子的克隆及功能研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2020.
Zhou JC. Cloning and preliminary function analysis of WRKY transcription factors in *Dioscorea composita* [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2020.

[36] 王丽娜, 王丰青, 智惊宇, 等. 盾叶薯蓣WRKY转录因子的鉴定和生物信息学分析 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4062-4071.
Wang LN, Wang FQ, Zhi JY, et al. Identification and bioinformatic analysis on rhizomes of *Dioscorea zingiberensis* WRKY transcription factor [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(22): 4062-4071.

[37] 丁夏威, 田泗, 陈健文, 等. 甘薯WRKY基因家族鉴定及其响应茎腐病侵染的表达分析 [J]. 江苏农业科学, 2024, 52(21): 25-39.
Ding XW, Tian T, Chen JW, et al. Identification of WRKY gene family and their expression analysis in response to stem rot infection in Ipomoea batatas [J]. Jiangsu Agric Sci, 2024, 52(21): 25-39.

[38] 刘欣童, 陈慧杰, 陈双双, 等. 绣球WRKY基因家族全基因组鉴定及其响应叶斑病的表达分析 [J]. 华北农学报, 2025, 40(1): 93-103.
Liu XT, Chen HJ, Chen SS, et al. Genome-wide characterization of WRKY gene family in *Hydrangea macrophylla* and expression analysis in response to leaf spot disease [J]. Acta Agric Boreali Sin, 2025, 40(1): 93-103.

[39] 张雅玲, 邓朝军, 苏文炳, 等. 枇杷WRKY基因家族鉴定及其表达分析 [J]. 福建农业学报, 2025, 40(5): 487-499.
Zhang YL, Deng CJ, Su WB, et al. Identification and expressions of WRKY family in *Eriobotrya japonica* [J]. Fujian J Agric Sci, 2025, 40(5): 487-499.

[40] 秦娟, 卢蔚雯, 李斌, 等. 红花WRKY基因家族全基因组鉴定及其表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 2025, 33(9): 1907-1920.
Qin J, Lu WW, Li B, et al. Genome wide identification and expression analysis of the WRKY gene family in safflower (*Carthamus tinctorius*) [J]. J Agric Biotechnol, 2025, 33(9): 1907-1920.

[41] Wang QS, Wang MH, Zhang XZ, et al. WRKY gene family evolution in *Arabidopsis thaliana* [J]. Genetica, 2011, 139(8): 973-983.

[42] Lei L, Dong K, Liu SW, et al. Genome-wide identification of the WRKY gene family in blueberry (*Vaccinium* spp.) and expression analysis under abiotic stress [J]. Front Plant Sci, 2024, 15: 1447749.

[43] 李宇静, 黄倩茹, 张爱冬, 等. 茄子*SmMYB13*基因在干旱胁迫响应中的功能 [J]. 浙江农业学报, 2025, 37(8): 1666-1679.
Li YJ, Huang QR, Zhang AD, et al. Function of the *SmMYB13* gene in drought stress response in eggplant (*Solanum melongena* L.) [J]. Acta Agric Zhejiangensis, 2025, 37(8): 1666-1679.

[44] You HL, Tang D, Liu HX, et al. Chromosome ends initiate homologous chromosome pairing during rice meiosis [J]. Plant Physiol, 2024, 195(4): 2617-2634.

[45] Tang J, Wang F, Hou XL, et al. Genome-wide fractionation and identification of wrky transcription factors in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) reveals collinearity and their expression patterns under abiotic and biotic stresses [J]. Plant Mol Biol Rep, 2014, 32(4): 781-795.

[46] Huang H, Zhao WC, Qiao H, et al. SlWRKY45 interacts with jasmonate-ZIM domain proteins to negatively regulate defense against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato [J]. Hortic Res, 2022, 9: uhac197.

[47] Liu DX, Fan JL, Ye Y, et al. The transcription factor BnaWRKY75 enhances resistance to the necrotrophic pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* by promoting salicylic acid biosynthesis in oilseed rape [J]. J Exp Bot, 2025, 76(20): 5877-5893.

（责任编辑　朱琳峰）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):122-133

亚麻荠*CsFAD*基因家族鉴定及α-亚麻酸合成关键基因*CsFAD3.3*的功能分析

高慧玲[1] 贾峥嵘[1] 薛金爱[2] 宋亚楠[2] 贾小云[3*] 李润植[2*]
（1.山西农业大学高粱研究所,榆次 030600；2.山西农业大学农学院,太谷 030800；3.山西农业大学生命科学学院,太谷 030800）

摘 要： 【目的】亚麻荠（*Camelina sativa* (L.) Crantz）是一种具有开发潜力的十字花科油料作物，其种子油富含不饱和脂肪酸。脂肪酸脱氢酶（fatty acid desaturase, FAD）是催化不饱和脂肪酸合成的关键酶，鉴定亚麻荠*CsFAD*基因家族并解析关键基因*CsFAD3.3*在α-亚麻酸（α-linolenic acid, ALA）合成中的功能，可为亚麻荠种子油脂品质改良提供理论支撑。【方法】利用全基因组数据结合生物信息学方法，对亚麻荠*CsFAD*基因进行系统鉴定，分析其染色体分布、系统发育关系、基因结构和保守基序；结合转录组和RT-qPCR数据分析基因的组织表达模式；采用亚细胞定位验证CsFAD3.3的细胞定位；通过转基因亚麻荠和烟草进行功能验证。【结果】共鉴定54个*CsFAD*基因，不均匀地分布在20条染色体上。系统发育树分析将其划分为6个亚家族，与基因结构和保守基序相一致。表达谱分析显示，*CsFAD*基因在不同的亚组中表达模式不相同，但在同一亚家族的表达模式一致，其中CsFAD3亚家族成员（尤其*CsFAD3.3*）主要在种子中表达。亚细胞定位证实CsFAD3.3定位于内质网。功能验证显示，过表达*CsFAD3.3*显著提高亚麻荠种子中ALA含量。此外，*CsFAD3.3*在本氏烟草（*Nicotiana benthamiana*）中的瞬时表达与在普通烟草（*N. tabacum*）中的稳定遗传转化，分别显著提升了叶片及转基因种子中的ALA含量。【结论】CsFAD3.3定位于内质网，是亚麻荠ALA合成的关键限速酶。过表达*CsFAD3.3*基因显著提高了亚麻荠种子、烟草叶片及烟草种子中的ALA含量，证实了其功能的保守性。

关键词： 亚麻荠；*FAD*基因家族；*CsFAD3.3*基因；表达模式分析；功能验证；α-亚麻酸
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1058

Genome-wide Identification of the *CsFAD* Gene Family in *Camelina sativa* and Functional Characterization of the Key Gene *CsFAD3.3* Involved in α-linolenic Acid Biosynthesis

GAO Hui-ling[1] JIA Zheng-rong[1] XUE Jin-ai[2] SONG Ya-nan[2] JIA Xiao-yun[3*] LI Run-zhi[2*]
(1. *Sorghum Research Institute, Shanxi Agricultural University, Yuci* 030600; 2. *College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu* 030800; 3. *College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu* 030800)

Abstract: 【Objective】*Camelina sativa* (L.) Crantz is a cruciferous oilseed crop with great development potential and its seed oil is rich in unsaturated fatty acids. Fatty acid desaturases (FADs) are key enzymes that catalyze the biosynthesis of unsaturated fatty acids. The identification of the *CsFAD* gene family in camelina and the functional characterization of the key gene *CsFAD3.3* involved in α-linolenic acid (ALA) biosynthesis may provide theoretical support for improving the oil quality of camelina seeds. 【Method】 Genome-wide data combined with bioinformatics approaches were used to identify the *CsFAD* gene family in camelina and to analyze chromosomal distribution, phylogenetic relationships, gene structures, and conserved motifs. Transcriptome data and RT-qPCR were employed to examine tissue-specific expression patterns. Subcellular localization assays were conducted to determine the localization of CsFAD3.3, and transgenic camelina and tobacco were generated for functional validation. 【Result】 A total of 54 *CsFAD* genes were identified, unevenly distributed across 20 chromosomes.

收稿日期：2025-10-03
基金项目：山西省博士毕业生来晋工作奖励经费科研项目（SXBYKY2024105），山西农业大学博士科研启动项目（2024BQ65），山西省基础研究计划（自由探索类）项目（202503021212177），国家自然科学基金项目（32201722）
*通信作者：李润植 rli2001@126.com，贾小云 jiaxiaoyun@sxau.edu.cn

Phylogenetic analysis classified them into six subfamilies, consistent with conserved structures and motif features. Expression profiling showed that *CsFAD* genes exhibited diverse expression patterns across different subgroups but similar patterns within the same subfamily. Notably, members of the CsFAD3 subfamily, especially *CsFAD3.3*, were predominantly expressed in seeds. Subcellular localization confirmed that CsFAD3.3 was located in the endoplasmic reticulum. Functional assays demonstrated that overexpression of *CsFAD3.3* significantly increased ALA content in camelina seeds. Moreover, both the transient expression in *N. benthamiana* leaves and the stable transformation in *N. tabacum* seeds demonstrated that *CsFAD3.3* could significantly enhance ALA accumulation in recipient leaves and transgenic seeds, respectively. 【Conclusion】 CsFAD3.3 is localized in the endoplasmic reticulum and functions as a key rate-limiting enzyme for ALA biosynthesis in camelina. Overexpression of *CsFAD3.3* significantly increased ALA content in camelina seeds, tobacco leaves, and tobacco seeds, confirming its functional conservation.

Keywords: *Camelina sativa* (L.) Crantz; *FAD* gene family; *CsFAD3.3* gene; expression pattern analysis; functional validation; α-linolenic acid

亚麻荠（*Camelina sativa* (L.) Crantz）作为一种新兴的非粮油料作物，凭借其较强的环境适应性（如耐旱、耐寒、低水肥需求）和抗病虫害能力，高度契合了现代农业低碳、环保、高效的发展需求，因而近年来备受关注[1-3]。亚麻荠种子含油量高达35%-50%，其中不饱和脂肪酸占比超过90%，主要成分为α-亚麻酸（C18:3Δ9, 12, 15, 31%-40%）、亚油酸（C18:2Δ9, 12, 20%-25%）和油酸（C18:1Δ9, 15%-20%）[4-6]。值得注意的是，亚麻荠种子中α-亚麻酸含量显著高于传统油料作物如大豆（*Glycine max*, 7%-10%）[7]和甘蓝型油菜（*Brassica napus*，约9%）[8]，使其在功能性油脂开发与生物基材料合成领域展现出独特优势。然而，亚麻荠脂肪酸代谢调控网络，尤其是关键限速酶的分子机制尚未完全阐明，这严重制约了该物种的定向遗传改良与工业化应用进程。

植物体内不饱和脂肪酸的合成主要由脂肪酸去饱和酶（fatty acid desaturase, FAD）家族催化。该家族根据其功能与亚细胞定位可分为*FAD4*、*FAD2/FAD6*、*FAD3/FAD7/FAD8*、*ADS*、*SLD*和*DES* 6个不同的亚家族。FAD成员通过在脂肪酸链特定位置引入双键，将饱和脂肪酸转化为不饱和脂肪酸，从而直接控制植物体内脂肪酸的不饱和程度与各组分比例，进而可通过影响膜的流动性及稳定性来提高植株的抗逆性[9-11]。大多数FAD蛋白中包含3个高度保守的组氨酸基序，这些基序对维持其催化活性至关重要[12]。在FAD成员中，ω-3脱氢酶是催化生成α-亚麻酸的关键酶。其中，FAD7和FAD8定位于叶绿体，在植物响应低温等环境胁迫中发挥非冗余作用[13]。而定位于内质网的FAD3，则是催化亚油酸（C18:2）转化为α-亚麻酸（α-linolenic acid, ALA）的关键酶，其活性与种子发育后期的油脂累积阶段高度协同，直接决定种子油中ALA的积累水平[14]。自拟南芥*FAD3*基因被成功克隆以来[15]，其同源基因已相继在大豆[16]、紫苏[17]等作物中得到克隆与验证。转基因研究进一步证实，*FAD3*的表达水平与种子中ALA含量呈显著正相关。近年来，基因编辑技术的应用为油脂组分定向改良提供了有力工具，例如，通过CRISPR-Cas9技术编辑亚麻荠*CsFAD2*基因，成功将其种子油中单不饱和脂肪酸含量提升至80%以上[18]。值得注意的是，亚麻荠作为一种异源六倍体植物，其基因组的复杂性导致*CsFAD*基因家族可能存在多个拷贝及功能分化现象。然而，目前相关研究多局限于单基因功能验证，缺乏在全基因组层面对该家族的系统演化分析及调控网络整合。

为此，本研究以亚麻荠SC-N16为材料，对*CsFAD*基因家族进行全基因家族鉴定，并分析其系统进化、基因结构及共线性关系。在此基础上，进一步聚焦于ALA合成关键候选基因*CsFAD3.3*，通过与内质网标记共定位明确其在内质网分布，并利用亚麻荠过表达与烟草异源表达体系验证其生物学功能。本研究旨在揭示多倍化事件对亚麻荠*CsFAD*基因家族扩张与分化的影响，并确认*CsFAD3.3*在ALA合成中的核心作用，以期为创制高ALA亚麻荠新种质提供关键靶基因，同时为解析多倍体作物的油脂代谢提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究使用的亚麻荠（SC-N16）、本氏烟草（*Nicotiana benthamiana*）、普通烟草（*N. tabacum*）由山西农业大学分子农业与生物能源研究所提供并种植。采集亚麻荠根、茎、叶、花，以及开花后10、20、30和40 d的种子，液氮速冻后于-80 ℃保存，用于后续分析。

1.2 方法

1.2.1 *CsFAD*家族成员的鉴定及蛋白序列特征分析 以拟南芥TAIR数据库（https://www.arabidopsis.org/）中20条AtFAD蛋白序列为参考，通过BlastP（e-value<1e-10，identity≥30%）在亚麻荠基因组数据库中检索同源基因，获得候选CsFAD蛋白序列。从PFAM数据库（http://pfam.xfam.org/）下载FA_desaturase结构域（PF00487）的隐马尔可夫模型（HMM）文件，利用HMMER3.3.2软件在亚麻荠基因组二次鉴定（e-value<1.0）。通过SMART数据库（https://smart.embl-heidelberg.de/）验证候选基因结构域完整性，剔除不完整序列。下载筛选后基因的CDS、基因组及蛋白序列，基于系统发育树拓扑结构和染色体定位结果，对54个*CsFAD*基因进行命名。用ExPasy-ProtParam工具（https://web.expasy.org/protparam/）分析蛋白分子量、理论等电点、氨基酸组成及不稳定指数等理化性质。

1.2.2 亚麻荠*CsFAD*家族的结构、染色体定位和共线性分析 运用MEME（http://meme-suite.org/）分析保守基序（最大motif数设为10），利用NCBI-CDD数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/docs/cdd_search.html）分析保守结构域。使用MEGA7软件对CsFAD蛋白序列进行多序列比对和邻接法（neighbor-joining）聚类分析，由TBtools软件可视化分析结果。依据基因位置信息，用TBtools绘制*CsFAD*基因染色体定位图。通过TBtools的One Step MCScanX分析基因重复事件，使用Dual Systeny Plotter分析亚麻荠与拟南芥、白菜*FAD*基因的共线性关系，并基于*Ka*/*Ks*计算模块分析基因对选择压力（*Ka*/*Ks*>1为正选择，*Ka*/*Ks*<1为纯化选择，*Ka*/*Ks*=1为中性选择）。

1.2.3 亚麻荠CsFAD家族的系统发育树分析 采用ClustalW对拟南芥20个AtFAD和亚麻荠54个CsFAD蛋白序列进行多序列比对。使用MEGA7软件，采用邻接法构建进化树（模式“Poisson correction”，缺口设置“Complete Deletion”，校验参数Bootstrap=1 000）。

1.2.4 亚麻荠*CsFAD*基因启动子顺式作用元件分析 通过TBtools从亚麻荠基因组gff文件中提取各*CsFAD*基因上游2 000 bp启动子序列，通过PlantCARE（http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/）进行顺式作用元件分析，利用TBtools进行可视化。

1.2.5 亚麻荠*CsFAD*基因表达模式分析 基于eFP网站（http://bar.utoronto.ca/efp_Camelina/cgi-bin/efpWeb.cgi）获取亚麻荠不同组织及种子发育阶段的RNA-seq数据。利用TBtools分析*CsFAD*基因的转录水平，并绘制表达热图。用EASYspin Plus Plant RNA Kit植物RNA快速提取试剂盒进行RNA提取，采用TransScript® Uni All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR（One-Step gDNA Removal）反转录试剂盒进行cDNA获取及YBR® Premix Ex Taq™ II定量分析试剂盒进行RT-qPCR分析。以*CsActin*为内参基因，使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因相对表达量。引物采用NCBI的Primer-BLAST（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/）设计（附表1）。

1.2.6 CsFAD3.3的亚细胞定位 基于亚麻荠*CsFAD3.3*基因的编码序列（CDS）设计克隆引物（附表1）。以开花后20 d种子cDNA为模板，PCR扩增不含终止密码子的CsFAD3.3 CDS序列，克隆至pCAMBIA1300载体中，构建由CaMV35S启动子驱动的CsFAD3.3-GFP融合表达载体。利用液氮冻融法将该载体和内质网定位Marker载体（35S::NES::mCherry）转化农杆菌。将携带两种载体的农杆菌（1∶1的体积比）共侵染本氏烟草叶片，暗培养3 d后利用激光共聚焦显微镜观察GFP荧光。

1.2.7 过表达*CsFAD3.3*转基因亚麻荠的培育与鉴定 采用冻融法将重组质粒CsFAD3.3-pCAMBIA1303转化农杆菌GV3101。参照Floral-dip法[19]转化亚麻荠：收集对数期农杆菌，重悬于转化缓冲液（1/2 MS培养基，5%蔗糖，0.02% Silwet L-77），调整OD_{600}=0.8。于盛花期将亚麻荠花序完全浸没于菌液中30 s，覆盖保鲜膜保湿并黑暗处理24 h后转入正常光照培

养。收获T_0代种子，在含50 μg/mL潮霉素的1/2 MS培养基上筛选获得T_1代阳性苗。连续3代在含潮霉素的1/2 MS培养基上筛选获得T_3代纯合株系。选取3株T_3代转基因株系及野生型（WT）植株，采集成熟种子经冷冻干燥后，采用氯仿-甲醇法提取总脂[20]；使用气相色谱（GC，Agilent 7890B，氢火焰检测器，HP-88色谱柱100 m×0.25 mm×0.20 μm）分析脂肪酸组成，以十七烷酸甲酯（C17:0）为内标计算各脂肪酸相对含量。

1.2.8　本氏烟草瞬时表达　采用冻融法将重组质粒CsFAD3.3-pCAMBIA1303转化农杆菌GV3101，挑取农杆菌单菌落于LB液体培养基（含卡那霉素）中振荡培养至对数期，离心收集菌体。使用侵染缓冲液（含10 mmol/L $MgCl_2$、10 mmol/L MES及150 μmol/L乙酰丁香酮）重悬并调整OD_{600}至0.6-0.8。室温避光静置2 h后，用无针头注射器自叶片背部侵染生长4-5周的本氏烟草。接种后植株于25 ℃正常光照培养48-72 h，采集叶片用于ALA含量测定。

1.2.9　过表达*CsFAD3.3*转基因烟草的培育与鉴定　采用叶盘转化法[20]转化普通烟草：将CsFAD3.3-pCAMBIA1303转化农杆菌GV3101，侵染预培养2 d的烟草叶片外植体。共培养（28 ℃，3 d）后在含潮霉素和头孢霉素的筛选培养基诱导抗性芽，切芽至生根培养基（1/2 MS+头孢霉素）获得完整植株并移栽。提取T_0代植株DNA进行PCR验证，收获种子并连续筛选至获得T_3代纯合株系，选取3株T_3代转基因株系及野生型种子，经冷冻干燥后，采用与亚麻荠相同的方法测定总脂含量及脂肪酸组分。

2　结果

2.1　全基因组鉴定获得54个亚麻荠*CsFAD*基因家族成员

基于拟南芥20个AtFAD蛋白序列，通过BlastP同源检索并结合PFAM和SMART数据库的结构域验证，在亚麻荠基因组中共鉴定出54个*CsFAD*家族成员（附表2）。这些CsFAD蛋白的氨基酸长度介于114（CsADS17）-923（CsADS1）之间，预测分子量为13.360 kD（CsADS17）-108.550 kD（CsADS1）。其等电点（pI）分布在5.22（CsADS1）-10.34（CsADS19）；除CsADS12（pI 5.22）为酸性蛋白（pI<7）外，其余53个均为碱性蛋白（pI>7）。不稳定指数分析显示，58%的CsFAD蛋白属于不稳定蛋白。疏水性分析表明，CsDES1.2、CsDES1.3、CsDES1.4、CsSLD1.1、CsSLD1.2、CsSLD1.3和CsADS17等7个成员为疏水蛋白，其余47个为亲水蛋白。跨膜结构域预测显示，除CsADS12、CsADS19、CsFAD4.1-CsFAD4.5蛋白无跨膜结构域外，其余47个CsFAD蛋白均含有2-10个跨膜结构域。

为了阐明*CsFAD*基因家族的序列结构特征，基于其蛋白序列构建系统发育树，并比较了保守基序（motif）、结构域及基因结构（图1）。系统进化分析显示，*CsFAD*家族划分为6个亚家族：*CsADS*、*CsSLD*、*CsDES*、*CsFAD4*、*CsFAD2*/*CsFAD6*（*ω6*）和*CsFAD3*/*CsFAD7*/*CsFAD8*（*ω3*）。保守基序分析（共10个基序）显示，同一亚家族成员通常由相同的基序组成，而不同亚家族间则存在显著差异。例如，motif 8在除*CsADS*外的所有亚家族中普遍存在；*ω3*和*CsFAD2*亚家族共享motif 5/6/8/9/10；*CsFAD6*亚家族与*CsFAD2*相比缺失motif 9；而*CsDES*和*CsSLD*亚家族除motif 8外，分别特有motif 5和motif 6；*CsFAD4*亚家族仅含motif 8；*CsADS*亚家族中，除*CsADS12*/*16*/*17*/*19*外，基本上都含有motif 1-5及motif 7。保守结构域分析表明，*ω-3*和*CsADS*亚家族属于膜结合FADS_like超基因家族；*CsFAD2*属于PLN02505家族；*CsFAD6*属于PLN02598家族；*CsDES*属于PLN02579超基因家族；*CsSLD*属于Delta-FAD-like家族；*CsFAD4*属于TMEM189_B域超基因家族。基因结构分析发现，*ω-3*基因含8个外显子和7个内含子，*CsFAD2*基因在外显子和内含子的结构上存在明显的差异，这可能表明*CsFAD2*基因之间可能行使不同的功能。*CsFAD6.3*含有12个外显子；*CsFAD6.1*和*CsFAD6.2*均含有10个外显子；*CsDES*基因均含2个外显子；除了*CsSLD2.3*和*CsFADA4.3*含有2个外显子外，其余的*CsSLD*基因和*CsFAD4*基因均含有1个外显子。以上结果表明，*CsFAD*基因家族在保守基序、结构域及基因结构上的特征与其系统进化关系高度吻合，共同揭示了该家族的演化路径与功能分化。

2.2　*CsFAD*基因家族的系统发育及扩张机制分析

为解析*CsFAD*基因家族的进化起源，构建亚麻荠与拟南芥FAD蛋白的系统发育树。结果显示（图2），亚麻荠*CsFAD*家族成员与拟南芥高度同源，

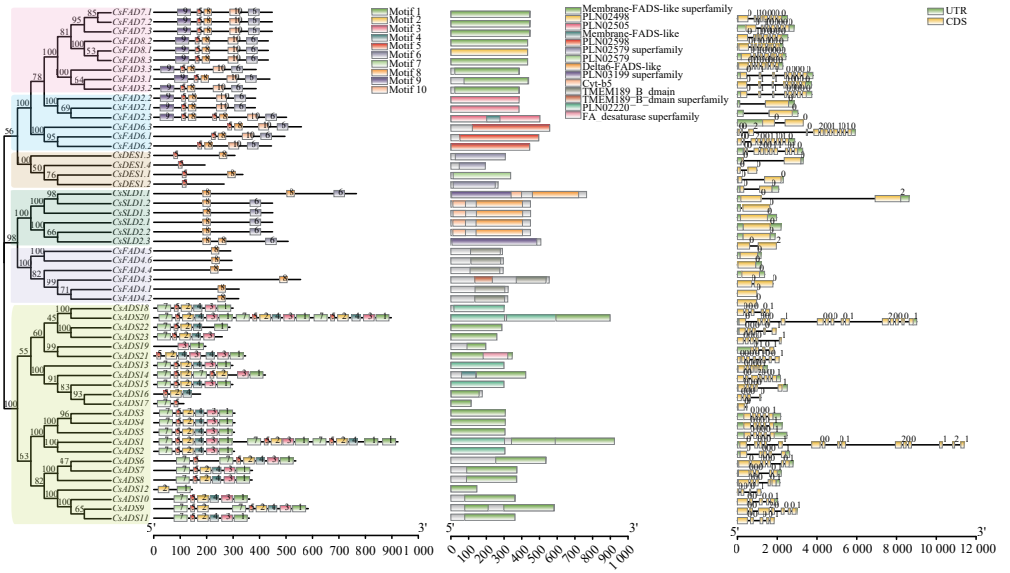


图1 亚麻荠*CsFAD*基因家族的系统发育树、基序、保守结构域和基因结构

Fig. 1 Phylogenetic tree, motif, conserved domain and gene structure of *CsFAD* gene family in camelina

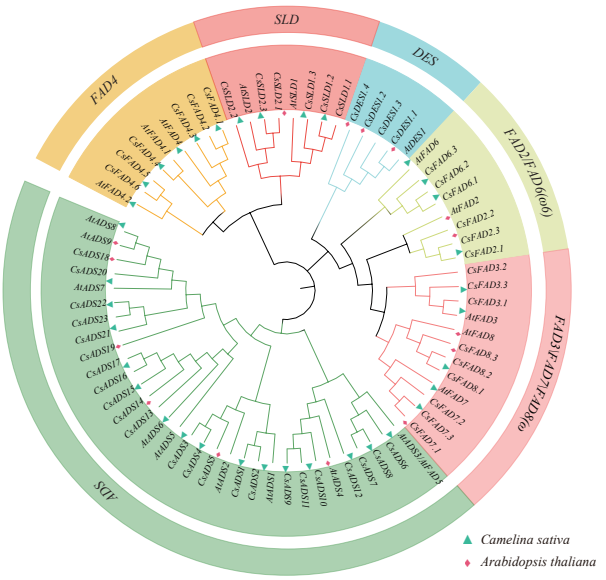


图2 亚麻荠*CsFAD*基因家族的进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *CsFAD* gene family in camelina

聚类为6个进化亚组，而且绝大多数*AtFAD*基因在亚麻荠中均对应存在3个同源拷贝，这一扩张模式充分体现了亚麻荠异源六倍体基因组在进化过程中发生的基因三倍化特征。

染色体定位分析（图3）显示，54个*CsFAD*基因在亚麻荠的20条染色体上呈不均匀分布。其中，17号染色体上的基因分布最多，共6个；而4、6和20号染色体上均仅含1个成员。进一步观察发现，在17号染色体上有一个明显的基因簇，该区域密集分布着6个*CsFAD*基因，这为串联重复驱动该基因家族的局部扩增提供了直接的基因组学证据。

为探究其扩张机制，进行共线性分析。物种内共线性分析（图4，附表3）鉴定到6对由串联重复产生的基因对（*CsADS15*/*CsADS16*、*CsADS10*/*CsADS12*、*CsADS2*/*CsADS18*、*CsADS18*/*CsADS22*、*CsADS22*/*CsADS21*、*CsADS14*/*CsADS17*），以及70对源于片段复制的*CsFAD*基因。表明串联重复和片段复制均参与了*CsFAD*基因家族的扩张，但片段复制的贡献更为显著，可能是驱动该家族扩张的主要机制。物种间共线性分析（图5）表明，亚麻荠与拟南芥间存在1 201个同源区块（包含81 245个共线性基因对，占比72.04%），与白菜间存在2 864个同源区块（包含84 845个共线性基因对，占比68.01%）。在此基础上，共鉴定出41个*CsFAD*基因与15个*AtFAD*基因形成60对直系同源基因（图5-A），29个*CsFAD*基因与41个*BrFAD*基因形成123对直系同源基因（图5-B）。值得注意的是，*CsFAD*基因与白菜间的共线性程度高于拟南芥，推测与亚麻荠和白菜均经历过3次全基因组复制事件有关。此外，对所有鉴定的*CsFAD*

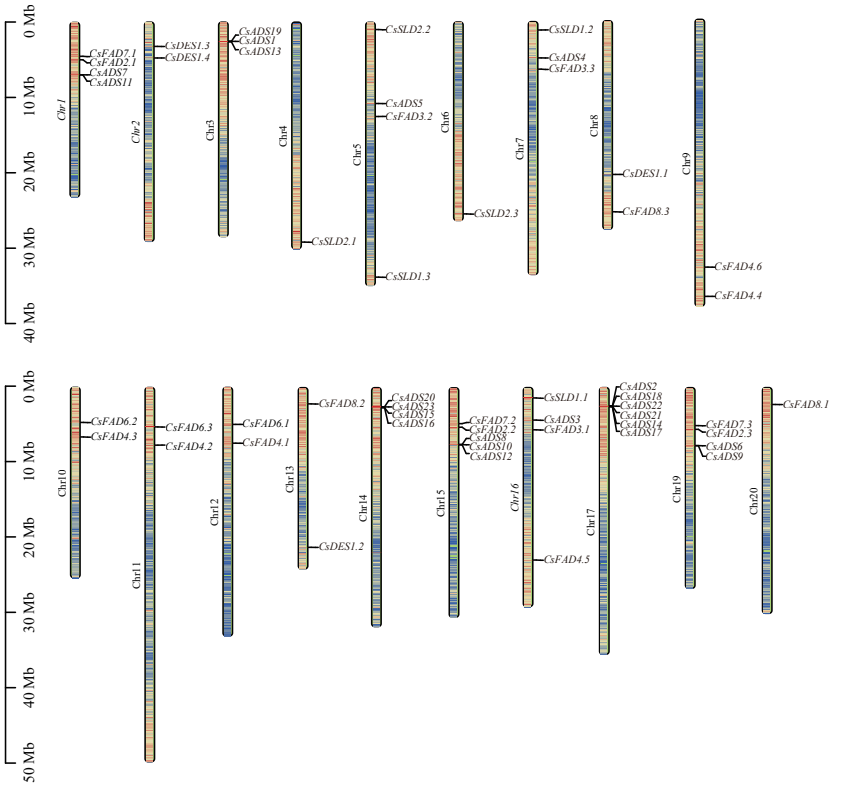


图3　亚麻荠*CsFAD*基因家族染色体定位

Fig. 3　Chromosome mapping of *CsFAD* gene family in camelina

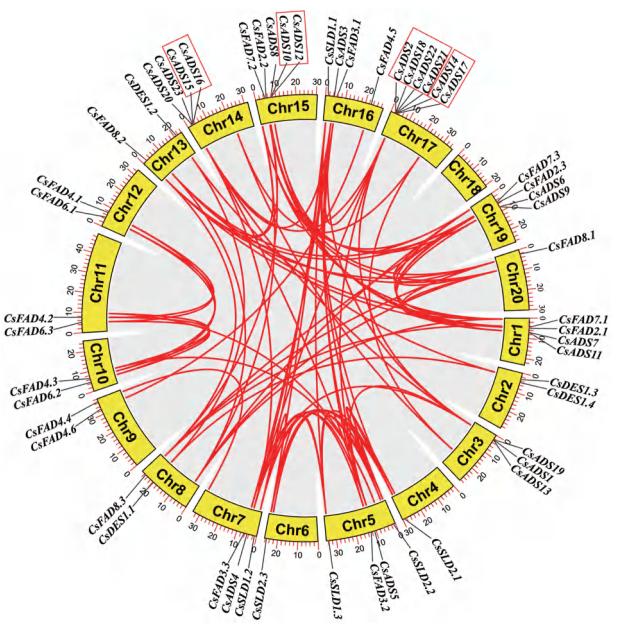


图4　亚麻荠*CsFAD*基因的种内共线性分析

Fig. 4　Intraspecific synteny analysis of *CsFAD* genes in camelina

直系同源基因对进行选择压力分析。结果显示（附表3），所有*CsFAD*同源基因对的非同义替换率（*Ka*）与同义替换率（*Ks*）比值（*Ka*/*Ks*值）均小于0.5，提示该家族在进化过程中受到了强烈的纯化选择，功能趋于保守。

根据亚麻荠基因组注释信息，亚麻荠基因组可分为3个异源亚基因组：Cs-G1亚组（Chr4、Chr11、Chr13、Chr15、Chr16、Chr17）、Cs-G2亚组（Chr6、Chr7、Chr8、Chr10、Chr14、Chr18、Chr19）以及Cs-G3亚组（Chr1、Chr2、Chr3、Chr5、Chr9、Chr12、Chr20）。据此，将54个*CsFAD*基因重新定位至上述3个亚基因组，并对其分布特征进行统计分析。结果显示（附表4），Cs-G1、Cs-G2和Cs-G3亚基因组分别包含20、16和18个*CsFAD*基因，整体分布较为均衡。进一步的*Ka*/*Ks*比值分析表明，6个亚家族的平均*Ka*/*Ks*值均小于1（范围0.23–0.46），表明所有成员均受到纯化选择压力。具体而言，*ω-6*亚家族（*CsFAD2/6*）的平均*Ka*/*Ks*值最低（0.046 5），

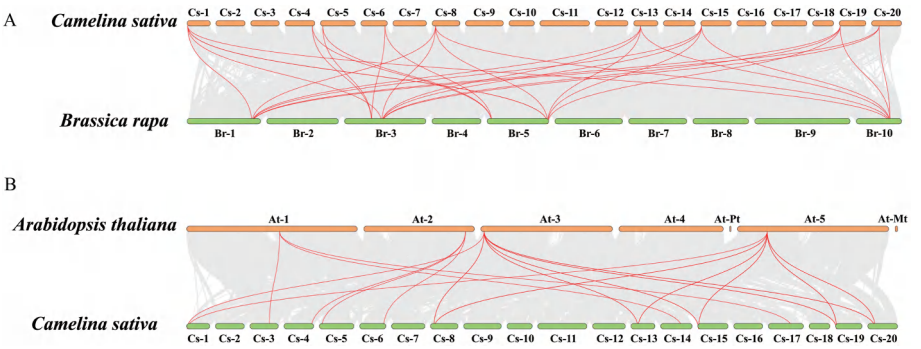


图5 亚麻荠与拟南芥(A)、白菜(B)*FAD*基因的共线性分析

Fig. 5 Synteny analysis of *FAD* genes between *Camelina sativa*, *Arabidopsis thaliana* (A), and *Brassica rapa* (B)

受选择约束最强；*ω-3*亚家族（*CsFAD3/7/8*）为0.165 1，*CsSLD*为0.141 5，*CsADS*为0.245 0，*CsFAD4*为0.251 6；而*CsDES*亚家族最高（0.403 8），说明其受到相对较弱的选择压力、分化速率较快。

2.3 *CsFAD*基因启动子顺式作用元件分析

基因功能往往与基因上游转录因子结合位点的顺式调控元件密切相关，利用PlantCARE数据库对*CsFAD*基因起始密码子上游2 000 bp启动子区域进行顺式作用元件分析。结果（图6）发现，*CsFAD*启动子富含多种功能元件，包括光响应元件（如G-box、box4、Sp1、GT1-motif）、激素响应元件（如赤霉素响应元件p-box、水杨酸响应元件TCA-element、生长素响应元件TGA-element、脱落酸响应元件ABRE）以及逆境胁迫响应元件（如低温响应元件LTR、干旱诱导元件MBS、厌氧诱导响应元件ARE）。这表明*CsFAD*基因的表达可能受光信号和多种激素调控。此外，41个*CsFAD*基因的启动子中鉴定到种子特异性调控元件，暗示这些基因参与种子发育调控。35个*CsFAD*基因启动子含有低温胁迫响应元件，绝大多数*CsFAD*基因（>90%）的启动子含有干旱胁迫响应元件，表明*CsFAD*基因可能广泛参与植物对低温、干旱等非生物胁迫的应答。综上，*CsFAD*启动子元件的多样性，暗示其参与复杂多样的生物学过程及信号通路响应。

2.4 *CsFAD*基因的转录表达模式

亚麻荠种子油富含ALA，为探究*CsFAD*基因表达模式与种子中ALA积累的关系，分析其在亚麻荠12个不同组织中的表达谱。结果显示（图7），*CsFAD*基因的表达具有显著的组织特异性，且同一亚家族成员普遍呈现相似的表达模式。*ω-6*亚家族成

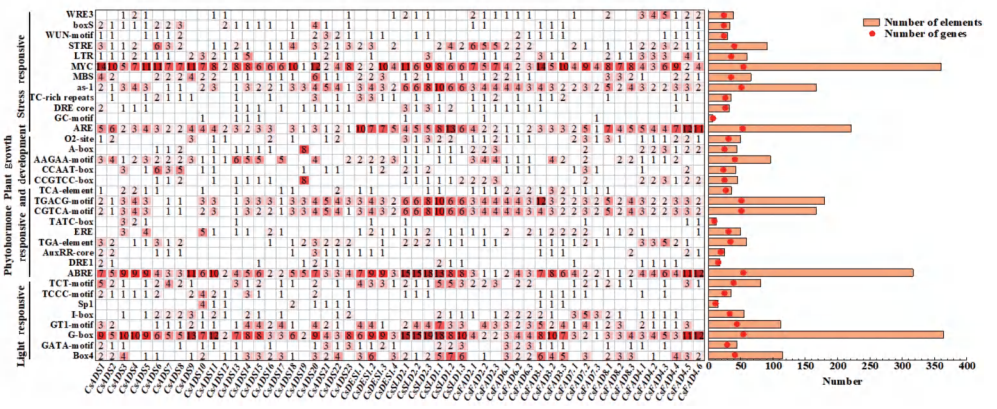


图6 亚麻荠*CsFAD*启动子序列顺式作用元件

Fig. 6 *Cis*-element analysis in camelina *CsFAD* promoter sequences

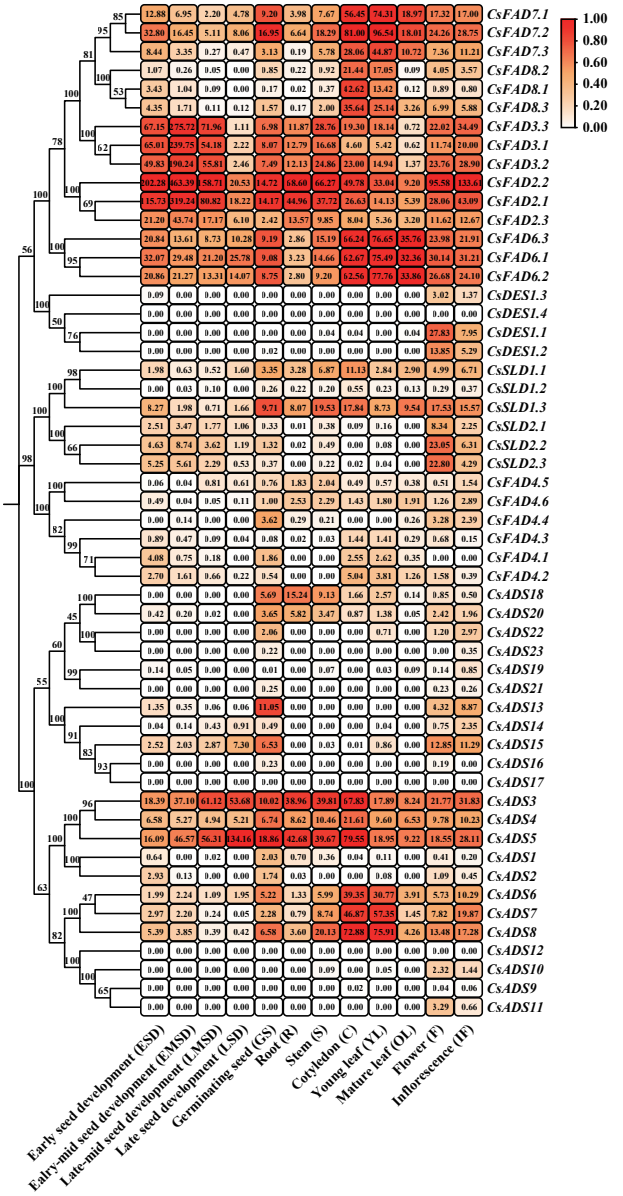


图7　亚麻荠*CsFAD*基因家族成员在不同组织及种子发育阶段的表达热图

Fig. 7　Expression heatmap of *CsFAD* family genes across various tissues and seed developmental stages in camelina

员在种子中特异性高表达，尤其是*CsFAD2.1*与*CsFAD2.2*，表明它们是催化种子中亚油酸合成的关键基因。*CsFAD6*则主要在营养器官（叶和花）中表达。在*ω-3*亚家族中，*CsFAD7*和*CsFAD8*基因在叶片中的表达量高，而*CsFAD3*主要在种子中表达，尤其是在开花后20 d的种子中表达量最高。进一步通过RT-qPCR对*CsFAD3*基因进行验证，结果与转录组数据高度一致（图8-A）。值得注意的是，在3个*CsFAD3*拷贝中，*CsFAD3.3*在种子中的表达水平显著高于*CsFAD3.1*和*CsFAD3.2*，并与种子油脂快速积累时期高度吻合（图8-B）。这些表达特征表明，CsFAD3.3是促进亚麻荠种子中ALA合成的核心成员，而不同亚家族成员的组织特异性表达则共同构成了亚麻荠不同器官中不饱和脂肪酸组成的代谢基础。

2.5　CsFAD3.3蛋白的亚细胞定位

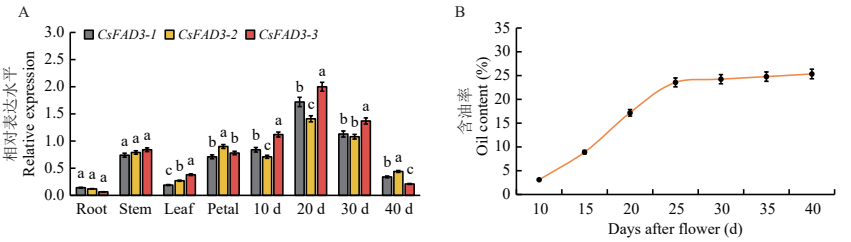
为明确CsFAD3.3蛋白的亚细胞定位，在本氏烟草叶片的表皮细胞中共表达CsFAD3.3-GFP融合蛋白（由CaMV35S启动子驱动）与内质网定位Marker（35S::ER::mCherry）。激光共聚焦显微镜观察显示（图9），CsFAD3.3-GFP的绿色荧光信号与内质网Marker的红色荧光信号（mCherry）高度重叠（呈现黄色），表明CsFAD3.3蛋白定位于内质网。

2.6　过表达*CsFAD3.3*改变亚麻荠种子含油量及其脂肪酸组成

为探究*CsFAD3.3*在亚麻荠种子中的生物学功能，构建*CsFAD3.3*基因的植物过表达载体，并利用花序侵染法成功转化亚麻荠。对随机选取的3株独立过表达（OE）纯合株系的成熟种子进行分析发现，过表达株系种子油脂含量较野生型（WT）显著提高约17.4%（图10-A），更重要的是，脂肪酸组成分析显示，过表达株系种子中的ALA含量相较于WT显著提升了约18.33%（图10-B）。这一功能获得性遗传证据充分证实，CsFAD3.3是促进亚麻荠种子油脂与ALA协同积累的关键功能基因。。

2.7　异源表达*CsFAD3.3*改变烟草油脂含量及其脂肪酸组成

为在异源系统中验证CsFAD3.3功能，分别进行烟草瞬时表达与稳定遗传转化分析。对瞬时表达的叶片及3株独立T_3代纯合转基因（OE）株系种子的分析表明，转基因烟草叶片总脂含量较野生型（WT）显著提高2.76%（图11-A）；而转基因种子的总脂含量显著提高7.56%（图11-C）。此外，在烟草中异源表达*CsFAD3.3*也可以使烟草叶片和种子中的脂肪酸脱饱和程度发生显著改变。与WT相比，过



采用RT-qPCR分析*CsFAD3*基因在根、茎、叶、花和开花后10、20、30和40 d种子的表达模式。以*CsActin*基因为内参基因，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算相对表达量。数据来源于3次生物学重复，以均值±标准差表示（n=3）。采用单因素方差分析（ANOVA）后进行Tukey事后检验，不同小写字母表示组间差异显著（P<0.05），下同

The expression patterns of *CsFAD3* genes in roots, stems, leaves, petals, and seeds at 10, 20, 30, and 40 days after flowering (DAF) were analyzed by RT-qPCR. *CsActin* was used as the internal reference gene, and the relative expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Data represent the mean ± standard deviation (SD) from three biological replicates (n=3). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test was performed to evaluate significant differences among groups, and different lowercase letters indicate statistically significant differences (P<0.05), the same below

图8 *CsFAD3*基因在不同组织及种子发育阶段的表达谱（A）以及亚麻荠种子发育过程中油含量的动态变化（B）

Fig. 8 Expression profiles of *CsFAD3* gene in different tissues and seed developmental stages (A) as well as dynamic changes in oil content during seed development of camelina (B)

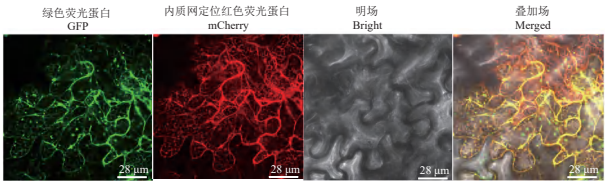


图9 CsFAD3.3蛋白的亚细胞定位

Fig. 9 Subcellular localization of the CsFAD3.3 protein

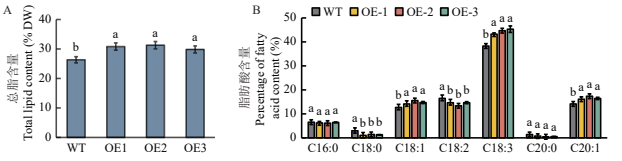


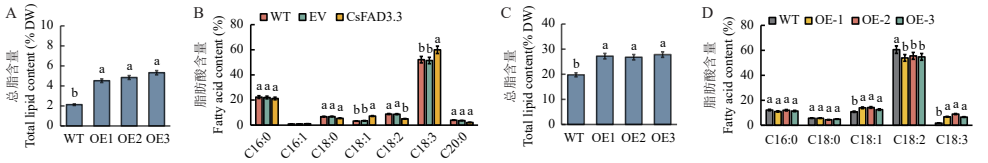
图10 过表达*CsFAD3.3*基因在亚麻荠种子中总脂含量（A）及脂肪酸成分（B）分析

Fig. 10 Analysis of total lipid content (A) and fatty acid composition (B) in camelina seeds overexpressing *CsFAD3.3*

表达*CsFAD3.3*烟草叶片和种子中的C18:3的含量显著提高（图11-B，D）。这一异源系统中的功能性互补实验充分证实，CsFAD3.3是一个能够同时增强油脂积累并特异性促进ALA合成的关键酶。

3 讨论

本研究在异源六倍体油料作物亚麻荠中系统鉴定了54个*CsFAD*基因，其非均匀染色体分布及扩增模式（如*ω-3*亚家族含9个成员）与亚麻荠基因组的3套同源亚基因组结构高度吻合，表明全基因组复制（WGD）事件是该家族扩张的主要驱动力；而随后的串联与片段复制进一步丰富了成员多样性。这种扩张模式与棉花、小麦等多倍体作物中*FAD*家族的



A、B：瞬时表达*CsFAD3.3*的烟草叶片总脂含量（A）及脂肪酸组分比例（B）；C、D：稳定转基因烟草种子中的总脂含量（C）及脂肪酸组分比例（D）

A, B: Total lipid content (A) and fatty acid composition (B) in tobacco leaves with transient expression of *CsFAD3.3*. C, D: Total lipid content (C) and fatty acid composition (D) in seeds of stable transgenic tobacco

图11 *CsFAD3.3*在烟草叶片瞬时表达及种子过表达体系中的功能验证

Fig. 11 Functional validation of *CsFAD3.3* through transient expression in tobacco leaves and stable overexpression in tobacco seeds

进化机制一致[21-23]，为亚麻荠适应复杂环境及油脂合成通路的功能冗余与分化提供了遗传基础。系统发育、保守基序及基因结构的综合分析共同支持将*CsFAD*划分为6个亚家族，其进化上的保守性为同源基因的功能推断提供了可靠分子框架。

基因的表达模式是解析其生物学功能的关键线索[24]，本研究通过RNA-seq分析，揭示了*CsFAD*各亚家族成员在亚麻荠不同器官中的功能分化：*CsFAD2.1*和*CsFAD2.2*在种子中高表达，与其主导亚油酸积累的功能相符[25-26]；*CsFAD6*在光合组织（叶/花）中高表达，暗示其可能参与膜脂修饰[27]；*CsFAD4.5*和*CsFAD4.6*基因在茎中高表达，鉴于FAD4是已知的唯一催化反式双键的去饱和酶[28]，暗示孢子体中的反式脂肪酸可能在茎中富集或通过茎运输；而*CsFAD3.3*在种子发育关键期（开花后20 d）的表达峰值与油脂快速积累同步，且符合牡丹、番茄等油料作物中*FAD3*表达与ALA积累的正相关规律[29-30]，表明该调控机制具有普遍的保守性。功能验证结果从体内和异源系统两个层面，共同确立了*CsFAD3.3*的核心功能：在亚麻荠中过表达*CsFAD3.3*可显著提升ALA含量和总脂含量；在烟草中异源表达*CsFAD3.3*同样提高叶片与种子中ALA水平与总脂含量，表明该基因功能的跨物种保守性。这一结果与拟南芥、番茄、大豆、牡丹等物种中*FAD3*的功能研究结论相呼应[30-33]。值得注意的是，本研究揭示了*CsFAD3.3*过表达所带来的“ALA比例与总油脂含量双增”现象，提示其可能通过影响前体代谢或下游酶（如ACC1、DGAT1）间接调控碳流分配。未来研究可结合代谢组学与关键酶活性分析，系统解析该间接效应的分子机制。

尽管本研究在基因家族鉴定及核心成员功能解析方面取得了进展，但仍存在局限。首先，关于*CsFAD*基因的调控网络解析仍停留在预测阶段。虽然启动子分析预测*CsFAD*基因可能受光、非生物胁迫及种子发育信号调控[13, 34-35]，且表达谱也显示*CsFAD7/8*在叶中高表达可能与低温响应相关[13]，但这些调控关系的实验证据仍待充实，上游转录因子及其作用网络尚未解析。其次，*CsFAD3.3*的表达高峰与油脂积累期同步，但缺乏同批次样品中ALA含量的直接测定与严格的统计学关联分析，使得“表达驱动合成”的因果链条有待进一步验证。此外，亚细胞定位方面，未来可结合游离GFP对照及免疫电镜技术，对其内质网定位进行更精确确认，从而全面解析该基因的功能与调控网络。

基于此，未来研究可从以下几个方面深入：首先，利用酵母单杂交、EMSA及ChIP-qPCR等技术，鉴定直接调控*CsFAD3.3*的关键转录因子，解析其响应环境与发育信号的分子机制；其次，在种子发育过程中同步进行转录组、靶基因表达量及脂肪酸组分的动态监测，直接计算并验证其表达与产物积累的相关性；最后，探索*CsFAD3.3*与油脂合成关键酶基因（如*DGAT1*）的协同效应，为利用多基因聚合策略改良亚麻荠油脂品质提供新思路。

综上所述，本研究系统解析了亚麻荠*CsFAD*基因家族的进化特征与表达模式，不仅强化了对FAD3功能保守性的认知，还挖掘并验证了*CsFAD3.3*在协同提升油脂品质与产量中的关键作用。这些发现为通过分子设计定向改良亚麻荠及同类油料作物的油脂品质奠定了重要的理论与基因资源基础。

4　结论

在亚麻荠中系统鉴定出54个*CsFAD*基因，将其划分为6个亚家族。*CsFAD3.3*定位于内质网中并在种子发育期特异性高表达，是催化ALA合成的关键基因。在亚麻荠和烟草中过表达*CsFAD3.3*均能显著提高种子中的ALA与总油脂含量，验证了其功能的保守性。

文章所有附表数据请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260413164820_NewsFile_75.pdf）。

参考文献

[1] 李飞飞, 魏悦, 于立芹, 等. 亚麻荠植株营养及功能成分质量评价 [J]. 湖北农业科学, 2023, 62(7): 126-129, 162.
Li FF, Wei Y, Yu LQ, et al. Quality evaluation of nutritional and functional components in *Camellia sativa* plants [J]. Hubei Agric Sci, 2023, 62(7): 126-129, 162.

[2] 苑丽霞, 毛雪, 高昌勇, 等. 新型工业油料作物亚麻荠: 从基因组到代谢工程 [J]. 植物生理学报, 2015, 51(8): 1204-1216.
Yuan LX, Mao X, Gao CY, et al. New type of industrial oilseed crop *Camelina sativa*: from genome to meta-bolic engineering [J].

Plant Physiol Commun, 2015, 51(8): 1204-1216.

[3] Yuan LX, Li RZ. Metabolic engineering a model oilseed *Camelina sativa* for the sustainable production of high-value designed oils [J]. Front Plant Sci, 2020, 11: 11.

[4] Sydor M, Kurasiak-Popowska D, Stuper-Szablewska K, et al. *Camelina sativa*. Status quo and future perspectives [J]. Ind Crops Prod, 2022, 187: 115531.

[5] Neupane D, Lohaus RH, Solomon JKQ, et al. Realizing the potential of *Camelina sativa* as a bioenergy crop for a changing global climate [J]. Plants, 2022, 11(6): 772.

[6] Arshad M, Mohanty AK, Van Acker R, et al. Valorization of *Camelina* oil to biobased materials and biofuels for new industrial uses: a review [J]. RSC Adv, 2022, 12(42): 27230-27245.

[7] Bukowski MR, Goslee S. Climate-based variability in the essential fatty acid composition of soybean oil [J]. Am J Clin Nutr, 2024, 119(1): 58-68.

[8] 尚丽平, 梁佩萱, 曹小东, 等. 甘蓝型油菜亚麻酸含量性状QTL定位与候选基因分析 [J]. 西北农业学报, 2025, 34(1): 24-34.
Shang LP, Liang PX, Cao XD, et al. QTL mapping and candidate gene identification for C18: 3 content in *Brassica napus* L [J]. Acta Agric Boreali Occidentalis Sin, 2025, 34(1): 24-34.

[9] Zhu SS, Zhu ZY, Wang HR, et al. Characterization and functional analysis of a plastidial *FAD6* gene and its promoter in the mesocarp of oil palm (*Elaeis guineensis*) [J]. Sci Hortic, 2018, 239: 163-170.

[10] Lu JY, Chen XY, Li JX, et al. Whole-genome identification of the flax fatty acid desaturase gene family and functional analysis of the *LuFAD2.1* gene under cold stress conditions [J]. Plant Cell Environ, 2025, 48(3): 2221-2239.

[11] Saini R, Kumar S. Genome-wide identification, characterization and *in-silico* profiling of genes encoding FAD (fatty acid desaturase) proteins in chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. Plant Gene, 2019, 18: 100180.

[12] Berestovoy MA, Pavlenko OS, Goldenkova-Pavlova IV. Plant fatty acid desaturases: role in the life of plants and biotechnological potential [J]. Biol Bull Rev, 2020, 10(2): 127-139.

[13] Román Á, Hernández ML, Soria-García Á, et al. Non-redundant contribution of the plastidial FAD8 ω-3 desaturase to glycerolipid unsaturation at different temperatures in *Arabidopsis* [J]. Mol Plant, 2015, 8(11): 1599-1611.

[14] Liu YH, Du ZL, Li Y, et al. Improving linolenic acid content in rapeseed oil by overexpression of *CsFAD2* and *CsFAD3* genes [J]. Mol Breed, 2024, 44(2): 9.

[15] Arondel V, Lemieux B, Hwang I, et al. Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in *Arabidopsis* [J]. Science, 1992, 258(5086): 1353-1355.

[16] Li Z, Wang Y, Yu LL, et al. Overexpression of the purple *Perilla* (*Perilla frutescens* (L.)) *FAD3a* gene enhances salt tolerance in soybean [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(13): 10533.

[17] Pham AT, Shannon JG, Bilyeu KD. Combinations of mutant *FAD2* and *FAD3* genes to produce high oleic acid and low linolenic acid soybean oil [J]. Theor Appl Genet, 2012, 125(3): 503-515.

[18] Lee KR, Jeon I, Yu HM, et al. Increasing monounsaturated fatty acid contents in hexaploid *Camelina sativa* seed oil by *FAD2* gene knockout using CRISPR-Cas9 [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 702930.

[19] Liu XJ, Brost J, Hutcheon C, et al. Transformation of the oilseed crop *Camelina sativa* by *Agrobacterium*-mediated floral dip and simple large-scale screening of transformants [J]. Vitro Cell Dev Biol Plant, 2012, 48(5): 462-468.

[20] Gao HL, Xue JN, Yuan LX, et al. Systematic characterization of CsbZIP transcription factors in *Camelina sativa* and functional analysis of CsbZIP-A12 mediating regulation of unsaturated fatty acid-enriched oil biosynthesis [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 270 (Pt 1): 132273.

[21] Kagale S, Koh C, Nixon J, et al. The emerging biofuel crop *Camelina sativa* retains a highly undifferentiated hexaploid genome structure [J]. Nat Commun, 2014, 5: 3706.

[22] Feng JY, Dong YT, Liu W, et al. Genome-wide identification of membrane-bound fatty acid desaturase genes in *Gossypium hirsutum* and their expressions during abiotic stress [J]. Sci Rep, 2017, 7: 45711.

[23] Hajiahmadi Z, Abedi A, Wei H, et al. Identification, evolution, expression, and docking studies of fatty acid desaturase genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 778.

[24] Inoue M, Horimoto K. Relationship between regulatory pattern of gene expression level and gene function [J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0177430.

[25] Sun DQ, Quan WZ, Wang D, et al. Genome-wide identification and expression analysis of fatty acid desaturase (*FAD*) genes in *Camelina sativa* (L.) Crantz [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(23): 14550.

[26] Hutcheon C, Ditt RF, Beilstein M, et al. Polyploid genome of *Camelina sativa* revealed by isolation of fatty acid synthesis genes [J]. BMC Plant Biol, 2010, 10: 233.

[27] Dong CJ, Cao N, Zhang ZG, et al. Characterization of the fatty acid desaturase genes in cucumber: structure, phylogeny, and expression patterns [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0149917.

[28] Horn PJ, Smith MD, Clark TR, et al. PEROXIREDOXIN Q stimulates the activity of the chloroplast 16: $1^{\Delta 3trans}$ FATTY ACID DESATURASE4 [J]. Plant J, 2020, 102(4): 718-729.

[29] Zhang QY, Yu R, Sun DY, et al. Comparative transcriptome analysis reveals an efficient mechanism of α-linolenic acid in tree peony seeds [J]. Int J Mol Sci, 2018, 20(1): 65.

[30] Yin DD, Xu WZ, Shu QY, et al. Fatty acid desaturase

3 (*PsFAD3*) from *Paeonia suffruticosa* reveals high α-linolenic acid accumulation [J]. Plant Sci, 2018, 274: 212-222.

[31] Puttick D, Dauk M, Lozinsky S, et al. Overexpression of a FAD3 desaturase increases synthesis of a polymethylene-interrupted dienoic fatty acid in seeds of *Arabidopsis thaliana* L [J]. Lipids, 2009, 44(8): 753-757.

[32] Domínguez T, HernÁndez ML, Pennycooke JC, et al. Increasing ω-3 desaturase expression in tomato results in altered aroma profile and enhanced resistance to cold stress [J]. Plant Physiol, 2010, 153(2): 655-665.

[33] Flores T, Karpova O, Su XJ, et al. Silencing of *GmFAD3* gene by siRNA leads to low alpha-linolenic acids (18: 3) of fad3-mutant phenotype in soybean [*Glycine max* (Merr.)] [J]. Transgenic Res, 2008, 17(5): 839-850.

[34] Yuan SW, Wu XL, Liu ZH, et al. Abiotic stresses and phytohormones regulate expression of *FAD2* gene in *Arabidopsis thaliana* [J]. J Integr Agric, 2012, 11(1): 62-72.

[35] Wang CT, Xu YN. The 5′ untranslated region of the FAD3 mRNA is required for its translational enhancement at low temperature in *Arabidopsis* roots [J]. Plant Sci, 2010, 179(3): 234-240.

（责任编辑　李楠）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):134-141

转录因子GhWRKY21调控棉花耐高温机制研究

王佳玉[1*] 王琛[2]
（1.酒泉职业技术大学,酒泉 735000; 2.山东农业大学,泰安 271000）

摘 要： 【目的】探究棉花WRKY转录因子GhWRKY21在耐高温胁迫中的分子机制，揭示其在棉花抗逆中发挥的功能。【方法】综合运用生物信息学、分子生物学和生物化学的方法，通过病毒介导的基因沉默技术在棉花中构建*GhWRKY21*沉默的植株材料，并对其开展初步功能验证；利用农杆菌介导的叶盘转化法，在烟草中获得*GhWRKY21*过表达转基因株系，通过种子萌发实验、幼苗表型分析、叶片保卫细胞显微观察及高温胁迫下活性氧积累检测等试验，从表型、细胞和生理水平系统评估GhWRKY21在植物热应激响应中的功能。【结果】GhWRKY21属于棉花WRKY转录因子家族中的IId亚族，其表达可受温度、H_2O_2及信号分子的诱导。功能研究表明，在棉花中沉默该基因可显著增强植株的耐热性；相反，在烟草中过表达*GhWRKY21*则导致转基因植株对高温更为敏感，具体表现为种子萌发率降低、根伸长减缓以及叶片保卫细胞气孔关闭能力减弱等现象。进一步的生理与分子证据表明，GhWRKY21可能通过调控活性氧（ROS）的积累，参与植物对高温胁迫的应答过程。【结论】GhWRKY21在植物高温胁迫响应中起负调控作用，其通过调节ROS稳态影响植物抗逆性。

关键词： 棉花；WRKY转录因子；GhWRKY21；烟草；高温；ROS；气孔
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1061

Mechanism of GhWRKY21 Transcription Factor in Regulating Cotton High Temperature Resistance

WANG Jia-yu[1*] WANG Chen[2]
（1. *Jiuquan Vocational Technical University, Jiuquan* 735000; 2. *Shandong Agricultural University, Tai'an* 271000）

Abstract: 【Objective】 To investigate the molecular mechanism of the cotton WRKY transcription factor GhWRKY21 under high-temperature stress and elucidate its functional role in cotton stress resistance. 【Method】 *GhWRKY21*-silenced cotton plants were constructed using virus-induced gene silencing (VIGS) and preliminarily functionally characterized. Concurrently, *GhWRKY21*-overexpressing transgenic tobacco lines were generated via *Agrobacterium*-mediated leaf disc transformation. Functional assessment of GhWRKY21 in heat-stress response was then conducted through a series of experiments spanning seed germination assays, seedling phenotypic analysis, microscopic examination of leaf guard cells, and measurement of reactive oxygen species (ROS) accumulation under high-temperature stress, thereby evaluating its role at phenotypic, cellular, and physiological levels. 【Result】 GhWRKY21 is a member of the IId subfamily of WRKY transcription factors in cotton. Its expression can be induced by temperature, H_2O_2, and signaling molecules. Functional analysis revealed that silencing *GhWRKY21* in cotton significantly enhanced thermotolerance. Conversely, its overexpression in tobacco increased sensitivity to heat stress, as evidenced by reduced seed germination rates, suppressed root elongation, and impaired stomatal closure in leaf guard cells. Further physiological and molecular evidence suggests that *GhWRKY21* may participate in the plant response to high-temperature stress by modulating the accumulation of ROS. 【Conclusion】 GhWRKY21 functions as a negative regulator in plant high-temperature stress responses by modulating ROS homeostasis, thereby influencing plant stress resistance.

Keywords: *Gossypium hirsutum*; WRKY transcription factor; GhWRKY21; tobacco; heat; ROS; stomata

收稿日期：2025-10-05
基金项目：酒泉市科技计划项目（2024CB1013）
*通信作者：王佳玉 jiayuw123@163.com

棉花（*Gossypium* spp）作为主要的棉纺织工业原料，是我国重要的经济作物和战略物资。我国棉区主要分布在黄河流域、长江流域和西北内陆，随着国家农业产业结构变更和资源分配调整，西北内陆棉区已然成为中国棉花的主要产区。就西北棉区而言，干旱和高温是严重影响棉花生产和品质的主要因素。转录因子（NAC、MYB、bHLH、WRKY等）作为信号传导调控网络中重要的组成基因，在植物响应生物和非生物胁迫过程中发挥功能[1]。WRKY转录因子是高等植物特有的转录因子，广泛参与调控植物对多种环境胁迫的应激响应。

WRKY转录因子可以通过与互作基因启动子中的W-box（C/TTGACT/C）元件特异性结合，调控下游基因的表达；也可以作为信号分子参与植物激素信号传导过程，从而调节植物应对各种环境胁迫时的反应[2]。有研究表明，在拟南芥中AtWRKY57可以直接与*NCED3*和*RD29A*启动子内的W-box元件结合，过表达*AtWRKY57*显著提高了植物的耐旱性[3]。在模式植物烟草中，过表达*GhWRKY17*显著降低了转基因植株的抗旱性和耐盐性[4]。过表达*GhWRKY27a*可以提高转基因植株对立枯丝核菌侵染的敏感性，同时降低了植株的抗旱性[5]。虽然已有大量研究证实了WRKY蛋白的功能，但由于功能的复杂性，WRKY转录因子对应激响应的调控机制仍有待进一步研究。

棉花生长过程中环境温度超过35 ℃，会出现不同程度的雄性不育[6]、蕾铃脱落[7]，引起减产[8-10]。另外，长时间的高温胁迫还会导致棉花纤维强度下降，纤维整齐度降低[11]。因此，解析棉花耐高温胁迫机理，挖掘其相关响应基因，对于开发棉花优质种质、培育优良品种，保障棉花生产可持续发展具有重要意义。

本研究从陆地棉（*Gossypium hirsutum* L.）中分离出一个IId族WRKY转录因子家族成员GhWRKY21。利用生物信息学、分子生物学、生物化学等技术，明确GhWRKY21在调控棉花非生物胁迫抗性方面发挥的作用，为培育棉花新品种提供优良种质资源。

1　材料与方法

1.1　材料

本研究以陆地棉和本氏烟草（*Nicotiana benthamiana*）为主要实验材料。棉花种子经湿纱布包裹后，置于培养箱中（28 ℃，1 500 lx光照强度，16 h光照/8 h黑暗循环，湿度50%）进行避光催芽。待子叶完全展开后，转移至水培系统或混合基质（基质：珍珠岩：蛭石：土壤=1∶1∶1∶1）中培养。烟草种子则直接播种于相同混合基质中，并在培养箱（24 ℃，100 μmol/(m^2·s）光照强度，16 h光照/8 h黑暗循环，湿度50%）中生长，期间定期浇灌自来水。

1.2　方法

1.2.1　GhWRKY21的生物信息学分析和基因克隆　根据NCBI和CottonGen网站公布的棉花*GhWRKY21*基因已知序列（GenBank登录号：KT983420），设计特异性引物WRKY21-5与WRKY21-3（附表），提取棉花RNA反转录为cDNA，以cDNA为模板进行PCR扩增，克隆并分离GhWRKY21的开放阅读框（ORF）。氨基酸序列数据来源于NCBI数据库（访问地址：https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）。利用MEGA 5.0软件，采用邻接法（Neighbor-Joining）进行系统发育分析。

1.2.2　农杆菌介导的基因沉默　根据病毒诱导基因沉默（VIGS）[12]的实验方法，将*GhWRKY21*的特异性序列插入pCLCrV-A载体中（相关引物序列见附表），分别将重组质粒和pCLCrV-A空载体转化进农杆菌EHA105。将含有pCLCrV-A重组质粒（pCLCrV-A-GhWRKY21）和含有pCLCrV-B质粒的等量农杆菌悬液混合接种至子叶舒展的7日龄棉花中，含有pCLCrV-A和pCLCrV-B的混合农杆菌悬浮液作为对照接种，接种后黑暗放置6 h后常规培养，3周后对基因沉默棉花株系进行功能分析。每个实验独立重复至少3次，每次接种实验组和对照组各15株。

1.2.3　农杆菌介导的叶盘转化法　将*GhWRKY21*cDNA全长序列插入到pBI121植物表达载体中与花椰菜花叶病毒（CaMV）35S启动子连接，然后将重组质粒导入根癌农杆菌（菌株LBA4404），采用叶盘法[12]进行转化，筛选卡那霉素（100 mg/L）抗性，获得转基因烟草。采用转基因T_2株系进行实验。

1.2.4　非生物胁迫处理　为初步探究GhWRKY21可能的生物学功能，选择7日龄（从播种开始计算）水培棉花幼苗分别进行不同温度（4、37、42 ℃）

处理，在1、2、4、6、8 h收集样本；将幼苗根部浸泡于甘露醇（100 μmol/L）溶液模拟干旱处理，或者涂抹H_2O_2（10 mmol/L）、ABA（100 μmol/L）、MeJA（100 μmol/L）、SA（2 mmol/L）或ET（5 mmol/L）于棉花子叶进行植物激素信号分子的诱导处理，相隔固定时间收集样本。收集处理后的棉花子叶，液氮冷冻保存。

1.2.5 高温胁迫处理 以过表达*GhWRKY21*的烟草（OE）和空载体对照烟草（Vec）种子进行发芽率和根生长试验。选取饱满完整的种子，用75%乙醇消毒2 min，无菌吐温水冲洗2次，再浸入2.6%次氯酸钠溶液消毒8 min，再次用无菌吐温水清洗3次，最后用滤纸吸干种子表面水分，逐粒散布在MS固体培养基上（全程在无菌情况下操作，每次每株系铺种子200颗）。将铺满种子的培养皿置于42 ℃培养箱黑暗培养6 h后正常光照培养，每天测量发芽率。此外，正常萌发的种子当胚根发育约3 d后，将芽移植到另外的MS固体培养基中，并在42 ℃培养箱中垂直放置，日常观察6 d后测量主根长度。每个实验独立重复至少3次。

幼苗高温响应试验采用5周龄棉花（第3片真叶完全展开）和8周龄烟草（竖膀期）。选择长势一致的植株，对照组常规培养，实验组42 ℃处理24 h后观察表型，收集子叶进行RNA提取或化学染色等后续分析。每次实验至少设置5组，每个实验独立重复至少3次。

1.2.6 二氨基苯丙胺(DAB)、氮蓝四唑(NBT)组织化学染色法 将经过高温胁迫处理后的植物叶片分别浸泡于DAB染色液（1 mg/mL，pH 3.8）和NBT染色液（0.1 mg/mL）中，室温黑暗孵育15 h以上，前者转移至95%乙醇脱色液中，沸水浴10 min后更换脱色液浸泡2-3 d观察拍照；后者转移至乙醇∶乳酸∶甘油=1∶1∶1的固定液中煮沸10 min，室温过夜后观察拍照。

1.2.7 RNA提取和RT-qPCR定量分析 开展*GhWRKY21*的表达模式分析、过表达及沉默植株鉴定等实验时，使用植物RNA快速提取试剂盒和Trizol试剂分别从棉花和烟草中提取总RNA，使用Vazyme反转录试剂盒合成cDNA单链，逆转录所得产物可直接用于实时荧光定量PCR（RT-qPCR）反应。

1.2.8 氧化胁迫实验 使用打孔器分别从8周龄对照植株和转基因株系相同部位的叶片上获得面积相等的圆片，随机放入不同浓度（0、400或600 μmol/L）甲基紫精（MV）溶液中，于培养箱孵育2 d，用95%乙醇提取叶绿素，使用分光光度法进行分析。

1.2.9 叶片保卫细胞气孔开度测定 高温处理烟草叶片后，取对照组和处理组植株相同部位的真叶，在水中用镊子撕取下表皮，制成临时玻片标本，用显微镜（AXIO）观察气孔状态，并测量开度。每片叶子观察3-5个视野，单次测量气孔至少50个，每个实验独立重复至少3次。

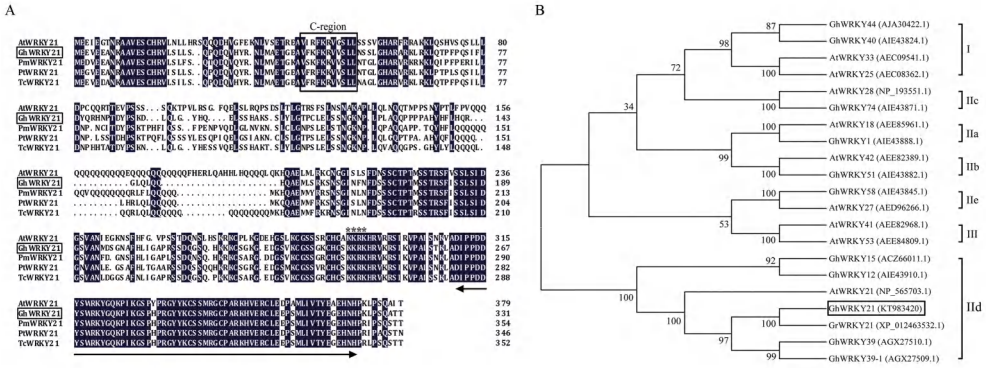
2 结果

2.1 *GhWRKY21*的克隆及生物信息学分析

本研究从棉花中克隆获得*GhWRKY21*基因（GenBank登录号：KT983420）。该基因全长1 494 bp，包含996 bp的开放阅读框（ORF），其5′非翻译区（UTR）和3′ UTR长度分别为173 bp和324 bp。通过多序列比对分析发现，GhWRKY21与同源蛋白的序列相似性介于57.59%-81.30%之间（图1-A）。进一步的生物信息学分析表明，GhWRKY21蛋白包含1个典型的WRKY结构域和1个C端锌指结构，符合IId亚家族WRKY转录因子的特征（图1-A）。系统进化分析结果进一步支持GhWRKY21属于IId亚家族（图1-B）。此外，在GhWRKY21蛋白序列的第289-292位氨基酸处鉴定到一个核定位信号（NLS）KKRK（图1-A）。

2.2 *GhWRKY21*的表达模式分析

为初步筛选*GhWRKY21*可能参与响应环境胁迫，本研究将7日龄棉花幼苗分别进行不同条件的胁迫处理。如图2所示，4 ℃的低温可以诱导*GhWRKY21*的表达，在4 h时表达量达到峰值；37 ℃以上的高温则明显抑制*GhWRKY21*的表达。本研究还检测了其对多种信号分子的响应，*GhWRKY21*的表达在脱落酸（ABA）、茉莉酸甲酯（MeJA）、水杨酸（SA）、乙烯（ET）和过氧化氢（H_2O_2）处理下均出现不同程度的上调，并在达到峰值后迅速下降。此外，H_2O_2处理棉花后，*GhWRKY21*的表达量也呈现出先升高后降低的相似趋势，并且在0.5 h时达到最高值。这些结果表明，*GhWRKY21*可能通过介导多条

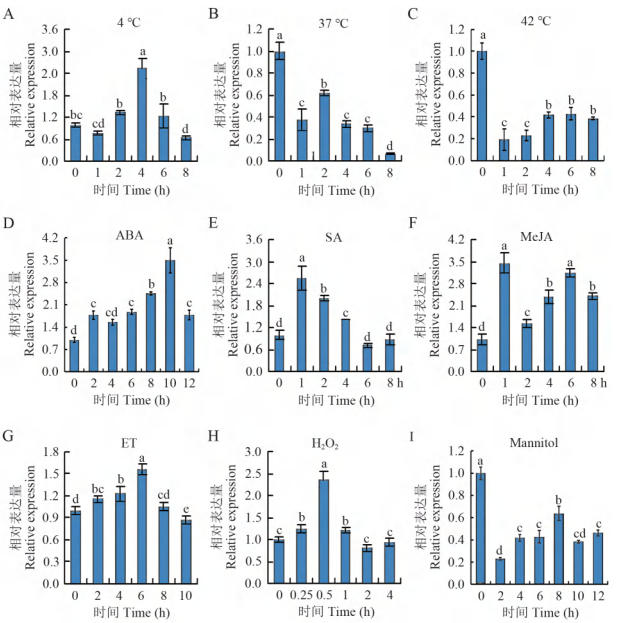


A：陆地棉GhWRKY21与拟南芥AtWRKY21、松树PmWRKY21、杨树PtWRKY21、红豆杉TcWRKY21的氨基酸序列同源性比对；黑色部分表示相同的氨基酸，WRKY结构域（60个氨基酸）用双向箭头标记，方框标注高度保守的WRKYGQK基序及C端保守序列；假定的核定位信号KKRK用****标记；B：显示WRKY家族的7个分组，用黑色矩形框标注GhWRKY21的位置，该进化树使用MEGA5.0构建

A: Amino acid sequence homology comparison of GhWRKY21 from *Gossypium hirsutum*, AtWRKY21 from *Arabidopsis thaliana*, PmWRKY21 from pine, PtWRKY21 from poplar, and TcWRKY21 from *Taxus chinensis*. The black regions indicate the same amino acids, where the 60-amino-acid WRKY domain is marked by a double-headed arrow. The boxed sequences are the highly conserved amino-acid sequence WRKYGQK and the conserved C-terminal motif. The putative nuclear localization signal, KKRK, is marked by asterisks (****). B: The phylogenetic tree shows the seven subgroups of the WRKY family. The position of GhWRKY21 is marked with a black rectangular box. The tree was constructed using MEGA 5.0

图1　不同物种WRKY21的氨基酸序列比对（A）和进化树分析（B）

Fig. 1　Amino acid sequence alignment (A) and phylogenetic analysis (B) of WRKY21 from different species



数据为3次独立实验的平均值±标准误差（SE）；经Tukey's HSD检验，误差线上不同字母表示组间差异具有统计学意义（P<0.05）。下同

Data are presented as the mean±standard error (SE) of three independent experiments. Different letters above the error bars indicate statistically significant differences among groups (P<0.05) based on Tukey's HSD test. The same below

图2　棉花中*GhWRKY21*的表达模式分析

Fig. 2　Expression pattern analysis of *GhWRKY21* in cotton

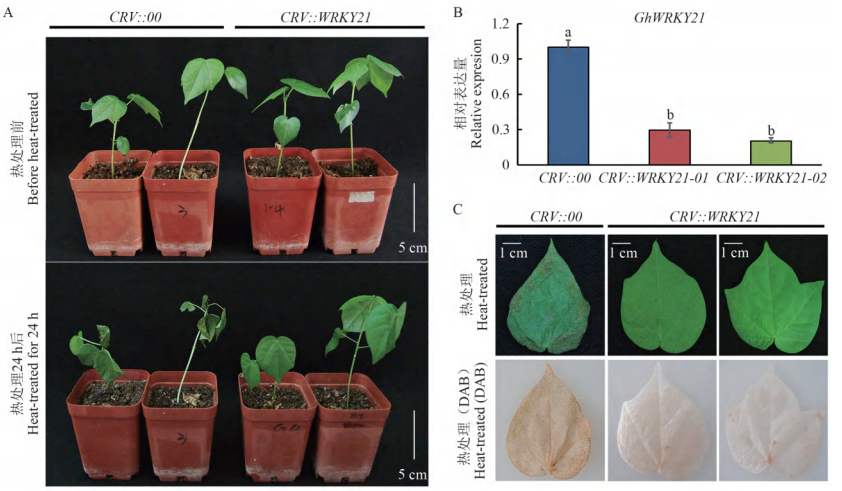
植物防御信号转导途径，参与对多种生物和非生物胁迫的响应。

2.3　沉默*GhWRKY21*提高了棉花的耐热性

利用VIGS技术制备*GhWRKY21*沉默棉花植株，在侵染21 d后，*GhWRKY21*的表达水平显著降低，选择表达量降低至30%以下的植株进行后续实验（图3-B）。高温（42 ℃，1 500 lx光照强度，16 h光照/8 h黑暗循环，湿度50%）处理24 h，空载体对照组棉花植株叶片明显萎蔫，*GhWRKY21*沉默棉花萎蔫程度较轻（图3-A）。对叶片进行染色处理（图3-C），空载体对照棉花叶片DAB染色、脱色后叶片颜色明显加深；*GhWRKY21*沉默棉花叶片染色较浅，说明沉默棉花在高温条件下叶片损伤程度轻，活性氧积累少。以上结果表明，在棉花中沉默*GhWRKY21*可以降低植物对高温胁迫的敏感性。

2.4　过表达*GhWRKY21*转基因烟草降低了植株的耐热性

受限于实验技术条件及时间因素，本研究未能成功获得*GhWRKY21*过表达的转基因棉花植株。因此，将*GhWRKY21*基因转入模式植物烟草中，成功构建了*GhWRKY21*过表达的转基因烟草株系。通过



A:*GhWRKY21*沉默棉花在高温胁迫处理(42 ℃,24 h)后的典型表型;B:*GhWRKY21*沉默棉花中*GhWRKY21*的表达水平;C:*GhWRKY21*沉默棉花在高温处理(42 ℃,24 h)后叶片的典型表型

A: Representative phenotypes of *GhWRKY21*-silenced cotton plants after heat stress (42 ℃, 24 h). B: Relative expression of *GhWRKY21* in *GhWRKY21*-silenced cotton. C: Representative leaf phenotypes of *GhWRKY21*-silenced cotton plants after heat treatment (42 ℃, 24 h)

图3 *GhWRKY21*基因沉默增强棉花的耐热性

Fig. 3 Silencing of *GhWRKY21* enhances heat tolerance in cotton

卡那霉素抗性筛选及RT-qPCR验证，筛选出2个独立的过表达株系（#2和#4，分别命名为OE2和OE4）。随后，将T_2代转基因植株与空载体对照（Vec）烟草一同种植，用于后续功能分析实验。

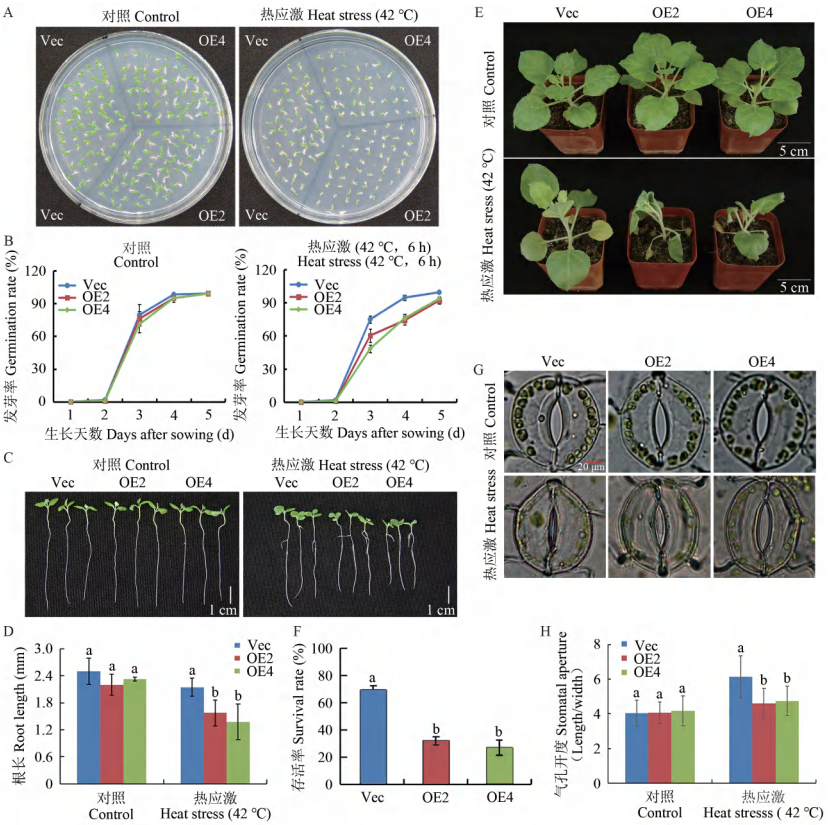
将转基因植株（OE2、OE4）和Vec植株的种子进行消毒，用滤纸吸干水分后逐粒平铺在MS固体培养基上进行培养，待种子开始萌发后，对照组正常管理，实验组高温（42 ℃）暗处理6 h后常规管理。如图4-A–B所示，对照组Vec和OE植株种子萌发率基本相同，实验组种子萌发受高温抑制，且OE植株受抑制高于Vec植株。另外，还观察了高温对植株种子萌发后根系生长的影响。如图4-C–D所示，对照组Vec和OE不同株系植株根长长势基本一致，实验组OE组烟草根长比Vec植株要短。说明*GhWRKY21*的过表达增强了植物种子萌发和根系生长过程中对热胁迫的敏感性。

选择8周龄的烟草植株进行高温处理（42 ℃）12 h，对照组常规培养，实验组OE植株最先发生明显萎蔫（图4-E），继续高温处理72 h后置于正常环境中培养，计算存活率（图4-F）。摘取高温处理12 h的实验组不同植株相同位置叶片进行观察并测量叶表皮保卫细胞的气孔孔径，如图4-G–H所示，对照组中Vec和OE植株的保卫细胞孔径大小基本一致，而实验组中，OE的气孔闭合情况明显不如Vec植株，说明高温使转基因植株气孔关闭功能受损更严重。

综上所述，过表达*GhWRKY21*提高了转基因烟草对高温胁迫的敏感性。

2.5 过表达*GhWRKY21*降低植株清除ROS的能力

对Vec和OE植株在高温胁迫下H_2O_2和O^{2-}的累积情况进行检测。摘取高温胁迫处理实验组不同株系植株相同位置叶片进行染色，如图5-A所示，OE植株较Vec植株着色更深，说明OE植株叶片中H_2O_2和O^{2-}的积累更多。随后，为了直接验证过表达*GhWRKY21*植物ROS清除能力，使用氧化剂MV进行模拟提高ROS积累，之后检测过表达植株的清除水平（图5-B、C），OE植株的叶片漂白或褪绿现象比Vec植株更严重，MV处理后Vec植株的叶绿素含量高于OE植株。这些数据表明，GhWRKY21会降低植株对氧化胁迫的耐受性，进而通过对ROS网络通路的调控在植物响应高温胁迫时发挥作用。



A、B：空载体对照和转基因植株烟草种子在热处理(42 ℃)6 h后的萌发情况；C、D：空载体对照和转基因植株种子在萌发后热处理(42 ℃)6 d后的根长表型及数据统计；E：8周龄空载体对照和转基因植株在高温处理(42 ℃)12 h后的表型；F：8周龄空载体对照和转基因植株在高温处理(42 ℃)12 h后常规培养存活情况；G、H：高温处理下(42 ℃，12 h)空载体对照和转基因植株气孔闭合程度

A, B: Seed germination phenotype and germination rates of Vec and OE tobacco lines exposed to heat stress (42 ℃, 6 h). C, D: Root length phenotype and statistical analysis of empty vector control and transgenic seeds after germination, exposed to heat stress (42 ℃) for 6 days. E: Phenotypes of Vec and OE plants grown to 8 weeks after 12 h high-temperature treatment (42 ℃). F: Survival rates of 8-week-old Vec and OE after a 12 h high-temperature treatment (42 ℃) followed by recovery under normal growth conditions. G, H: Stomatal closure degree of Vec and OE lines under heat stress (42 ℃, 12 h)

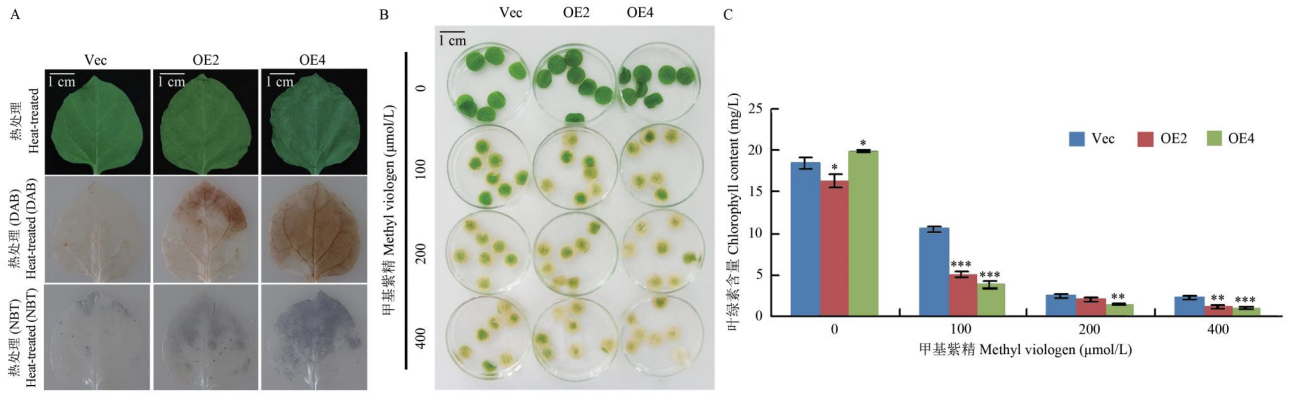
图4　*GhWRKY21*过表达植株对热胁迫的敏感性增加

Fig. 4　Overexpression of *GhWRKY21* increases the sensitivity to heat stress in transgenic plants

3　讨论

3.1　GhWRKY21在调节棉花响应高温胁迫时起负调控作用

WRKY是植物中最重要的转录因子（transcription factor, TF）之一，其作用在多种植物中均有报道。拟南芥突变体*wrky11*和*wrky17*在病原菌侵染时抗病性增强，表明WRKY11和WRKY17在生物胁迫中发挥了负调控作用[13]。在玉米中，盐胁迫和干旱胁迫可以诱导*ZmWRKY58*的表达，而过表达*ZmWRKY58*可以通过提高转基因水稻的相对含水量和存活率来降低转基因水稻对盐胁迫和干旱的敏感性[14]，*ZmWRKY106*的过表达通过ABA信号通路调控胁迫相关基因，提高了转基因拟南芥对干旱和高温的耐受性[15]。在番茄中SlWRKY55与SlVQ11协同作用，通过激活*SlHsfA2*增强番茄耐热性[16]。在苹果中MdWRKY75可以结合热休克基因的启动子并激活它们的表达，增加植物的耐热性[17]。IId WRKY TF在植物响应环境胁迫时意义重大，有研究证明，在烟草中过表达*GhWRKY17*可以调控ABA信号通路进而增加植物对盐和干旱的敏感性[4]；*GhWRKY39*过表达烟草的耐盐性和抗病性显著增强，表明GhWRKY39是植物胁迫响应的正调控因子[18]。



A:空载体对照和转基因植株叶片经高温处理后DAB和NBT染色的典型表型;B:空载体对照和转基因烟草植株在含不同浓度MV中培养时的表型;C:对图B中不同浓度下空载体对照和转基因烟草植株叶圆片叶绿素含量进行测定;经Tukey's HSD检验,*P<0.05,** P<0.01,***P<0.001

A: Representative phenotypes of leaves from Vec and OE plants showing DAB and NBT staining after heat treatment. B: Phenotypes of leaf discs obtained from Vec and OE plants after being incubated in different concentrations of MV. C: The chlorophyll content of tobacco leaf discs from empty vector control and transgenic plants under different concentrations was quantified in Fig. B. Tukey's HSD test , * P<0.05, ** P<0.01, and *** P<0.001

图5 过表达*GhWRKY21*的转基因烟草对氧化应激敏感

Fig. 5 Overexpression of *GhWRKY21* increases the sensitivity of transgenic tobacco plants to oxidative stress

以上结果说明，IId族WRKY TFs的功能是复杂的，因此详细研究IId WRKY TF的功能很有必要。在之前的研究中，我们已经证明GhWRKY21可以通过调控ABA介导的信号通路来调节植株的耐旱性[19]。本研究发现沉默*GhWRKY21*可以提高棉花对高温的耐受性。进一步实验证明，*GhWRKY21*过表达转基因植株在高温胁迫下热敏感性增加，发芽率降低，保卫细胞热损伤严重，这些结果都表明，GhWRKY21在调节棉花响应高温胁迫时起负调控作用。

3.2 GhWRKY21通过调节植株体内ROS的水平以响应高温胁迫

ROS信号途径是植物响应外界胁迫不可缺少的调控方式之一。植物体内低浓度的ROS可以发挥信号分子的作用，但是当ROS大量积累时则会引起氧化损伤，故调节植物体内ROS的含量维持适当水平是至关重要的[20]。O^{2-}和H_2O_2是ROS传导过程中两大重要的信号分子[21]，其含量对于保卫细胞而言可以影响ABA所调控的植物气孔闭合[22-23]。先前的研究提出当ROS的含量增加时，植物体可以通过诱导*SOD*、*CAT*、*APX*等抗氧化基因的表达，增强各组织中这些对应的抗氧化酶的活性来减轻植物的氧化损伤[23]。干旱胁迫可以诱导ABA的产生，进而激活植物抗氧化防御系统，此时植物可以通过增加活性氧清除酶的活性来减少ROS的含量，保护自身免受氧化应激的侵害[24]。在本研究中，DAB和NBT组织化学染色结果表明，高温胁迫下*GhWRKY21*的表达水平可以影响植物体内ROS的积累，而且*GhWRKY21*在棉花中的表达量能够被H_2O_2诱导，据此推测GhWRKY21还参与了植物氧化胁迫应答反应。通过对*GhWRKY21*过表达转基因烟草的进一步研究，分析MV模拟环境氧化胁迫的实验结果，发现*GhWRKY21*过表达植株对氧化胁迫更为敏感，从而验证了GhWRKY21可能通过调节ROS水平参与植物的非生物胁迫反应。

4 结论

GhWRKY21是棉花IId族WRKY转录因子之一，其表达量受温度、H_2O_2和各种信号分子的诱导。沉默*GhWRKY21*会提高棉花的耐热性。在转基因烟草的种子萌发期、幼苗期，GhWRKY21在响应高温胁迫时发挥负调控作用；高温胁迫下GhWRKY21可以通过调节植物ROS的积累来参与植物的非生物胁迫反应。

文章所有附表数据请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260427093555_NewsFile_41.pdf）。

参考文献

[1] Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, et al. Structures and evolutionary origins of plant-specific transcription factor DNA-binding domains [J]. Plant Physiol Biochem, 2008, 46(3): 394-401.

[2] Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. Trends Plant Sci, 2000, 5(5): 199-206.

[3] Jiang YJ, Liang G, Yu DQ. Activated expression of WRKY57 confers drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. Mol Plant, 2012, 5(6): 1375-1388.

[4] Yan HR, Jia HH, Chen XB, et al. The cotton WRKY transcription factor GhWRKY17 functions in drought and salt stress in transgenic *Nicotiana benthamiana* through ABA signaling and the modulation of reactive oxygen species production [J]. Plant Cell Physiol, 2014, 55(12): 2060-2076.

[5] Yan Y, Jia HH, Wang F, et al. Overexpression of GhWRKY27a reduces tolerance to drought stress and resistance to *Rhizoctonia solani* infection in transgenic *Nicotiana benthamiana* [J]. Front Physiol, 2015, 6: 265.

[6] 胡启瑞, 宋桂成, 王雪姣, 等. 高温对陆地棉花粉萌发及棉铃发育的影响 [J]. 新疆农业大学学报, 2017, 40(1): 1-7.
Hu QR, Song GC, Wang XJ, et al. Effects of high temperature on pollen germination and boll development in upland cotton [J]. J Xinjiang Agric Univ, 2017, 40(1): 1-7.

[7] 刘群, 陈振, 张巨松, 等. 高温胁迫对海岛棉光合生理及棉铃发育的影响 [J]. 西北植物学报, 2020(9): 1574-1581.
Liu Q, Chen Z, Zhang JS, et al. Effect of high temperature stress on photosynthetic physiology and boll development of island cotton [J]. Acta Bot Boreali Occidentalia Sin, 2020(9): 1574-1581.

[8] Cottee NS, Tan DKY, Bange MP, et al. Multi-level determination of heat tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) under field conditions [J]. Crop Sci, 2010, 50(6): 2553-2564.

[9] Song GC, Wang MM, Zeng B, et al. Anther response to high-temperature stress during development and pollen thermotolerance heterosis as revealed by pollen tube growth and *in vitro* pollen vigor analysis in upland cotton [J]. Planta, 2015, 241(5): 1271-1285.

[10] Min L, Li YY, Hu Q, et al. Sugar and auxin signaling pathways respond to high-temperature stress during anther development as revealed by transcript profiling analysis in cotton [J]. Plant Physiol, 2014, 164(3): 1293-1308.

[11] Pettigrew WT. The effect of higher temperatures on cotton lint yield production and fiber quality [J]. Crop Sci, 2008, 48(1): 278-285.

[12] 王佳玉. 棉花转录因子GhWRKY21调控植株抗旱和耐高温的分子机理研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2020.
Wang JY. Moleculor mechanism of cotton GhWRKY21 transcription factor regulating plant drought and high temperature resistance [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2020.

[13] Journot-Catalino N, Somssich IE, Roby D, et al. The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell, 2006, 18(11): 3289-3302.

[14] Cai RH, Zhao Y, Wang YF, et al. Overexpression of a maize *WRKY58* gene enhances drought and salt tolerance in transgenic rice [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2014, 119(3): 565-577.

[15] Wang CT, Ru JN, Liu YW, et al. Maize WRKY transcription factor ZmWRKY106 confers drought and heat tolerance in transgenic plants [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 3046.

[16] Ma JL, Wang YY, Hong YH, et al. SlWRKY55 coordinately acts with SlVQ11 to enhance tomato thermotolerance by activating *SlHsfA2* [J]. Plant J, 2024, 119(6): 2904-2918.

[17] Zhang ZJ, Yang C, Xi J, et al. The MdHSC70-MdWRKY75 module mediates basal apple thermotolerance by regulating the expression of heat shock factor genes [J]. Plant Cell, 2024, 36(9): 3631-3653.

[18] Shi WN, Hao LL, Li J, et al. The *Gossypium hirsutum WRKY* gene *GhWRKY39-1* promotes pathogen infection defense responses and mediates salt stress tolerance in transgenic *Nicotiana benthamiana* [J]. Plant Cell Rep, 2014, 33(3): 483-498.

[19] Wang JY, Wang LJ, Yan Y, et al. GhWRKY21 regulates ABA-mediated drought tolerance by fine-tuning the expression of *GhHAB* in cotton [J]. Plant Cell Rep, 2021, 40(11): 2135-2150.

[20] Mittler R, Zandalinas SI, Fichman Y, et al. Reactive oxygen species signalling in plant stress responses [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022, 23(10): 663-679.

[21] Averill-Bates D. Reactive oxygen species and cell signaling. Review [J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Res, 2024, 1871(2): 119573.

[22] Li SH, Liu S, Zhang Q, et al. The interaction of ABA and ROS in plant growth and stress resistances [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 1050132.

[23] Waszczak C, Carmody M, Kangasjärvi J. Reactive oxygen species in plant signaling [J]. Annu Rev Plant Biol, 2018, 69: 209-236.

[24] Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, et al. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses [J]. Plant Cell Environ, 2010, 33(4): 453-467.

（责任编辑　李楠）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):142-152

葡萄苹果酸脱氢酶*MDH*基因家族鉴定及*VvMDH10*基因功能分析

高亮[1] 崔鑫源[1] 刘名原[1,2] 韩蕾[1*]
（1.鲁东大学园艺学院,烟台 264025；2.山东省蚕业研究所,烟台 264002）

摘 要： 【目的】探究葡萄（*Vitis vinifera*）苹果酸脱氢酶（malate dehydrogenase, MDH）的基因结构与表达，揭示*VvMDH*基因的生物学功能，为进一步培育优质葡萄品种提供参考。【方法】利用生物信息学方法对葡萄11个*MDH*基因进行鉴定，并分析其蛋白理化性质、基因同源性、染色体位置、保守基序（motif）、基因结构和启动子区域等，实时荧光定量PCR（RT-qPCR）验证葡萄*MDH*基因家族成员在干旱和盐碱胁迫下的表达模式。利用花序浸染法获得异源过表达*VvMDH10*的拟南芥植株，进行干旱表型分析，探究*VvMDH10*对植株抗旱性的影响。【结果】共鉴定到11个*VvMDH*基因家族成员不均匀分布在9条染色体上。理化性质分析表明，VvMDH多为碱性蛋白，亚细胞定位预测显示VvMDH分布于细胞质基质、叶绿体和线粒体。系统发育分析将VvMDH成员分为5个亚家族，与拟南芥同源蛋白聚类模式高度保守。同一亚族成员具有相似的基因结构及motif分布。启动子顺式作用元件分析结果显示，*VvMDH*基因富含光响应、激素应答及干旱等胁迫响应元件，表明*VvMDH*基因可能受到多种植物激素或胁迫的调控。转录组数据分析显示，*VvMDH*在不同组织间特异性表达。RT-qPCR结果表明，干旱及盐碱处理能够诱导多个*VvMDH*基因的表达，尤其在干旱胁迫下，*VvMDH10*的表达量显著上调。异源过表达*VvMDH10*的拟南芥离体叶片失水率显著低于野生型，干旱处理后，过表达植株生物量和抗氧化相关酶活性显著高于野生型，体内MDA含量显著低于野生型。【结论】*VvMDH10*基因能够正向调控植株的抗旱性，可作为葡萄抗旱分子育种的基因资源。

关键词： ‘马瑟兰’葡萄；苹果酸脱氢酶(MDH)；*VvMDH10*；抗旱；耐盐碱；全基因组鉴定；过表达
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-0661

Identification of Malate Dehydrogenase *MDH* Gene Family and Functional Characterization of *VvMDH10* in Grape

GAO Liang[1] CUI Xin-yuan[1] LIU Ming-yuan[1,2] HAN Lei[1*]
（1. *College of Horticulture, Ludong University, Yantai* 264025; 2. *Shandong Sericultural Research Institute, Yantai* 264002）

Abstract: 【Objective】To investigate the gene structure and expression of malate dehydrogenase (MDH) in grapevine (*Vitis vinifera*), and to provide insights into the biological functions of *VvMDH* genes and to support further breeding of high-quality grape varieties. 【Method】Bioinformatics approaches were employed to identify 11 *MDH* genes in grapevine, followed by analyses of their protein physicochemical properties, gene homology, chromosomal locations, conserved motifs, gene structures, and promoter regions. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to validate the expression patterns of *VvMDH* gene family members under drought and saline-alkali stress conditions. *Arabidopsis* plants heterologously overexpressing *VvMDH10* were obtained using the floral dip method for drought phenotype analysis, to investigate the effect of *VvMDH10* on plant drought tolerance. 【Result】A total of 11 *VvMDH* gene family members were identified, unevenly distributed across 9 chromosomes. Physicochemical analysis revealed that most VvMDH proteins are alkaline. Subcellular localization predictions indicated VvMDH is located in the cytosol, chloroplasts, and mitochondria. Phylogenetic analysis classified the *VvMDH* members into 5 subfamilies, showing high conservation in clustering patterns with homologous proteins from *Arabidopsis*. Members of the same subfamily

收稿日期：2025-06-23
基金项目：山东省自然科学基金项目（ZR2021MC086）
*通信作者：韩蕾 hanlei@ldu.edu.cn

exhibited similar gene structures and motif distributions. Promoter *cis*-acting element analysis demonstrated that *VvMDH* genes are enriched with light-responsive, hormone-responsive, and stress-responsive elements (e.g., drought stress), suggesting their potential regulation by various phytohormones or stresses. Transcriptome data revealed tissue-specific expression patterns of *VvMDH* genes. RT-qPCR results indicated that drought and saline-alkali treatments could induce the expression of multiple *VvMDH* genes, with *VvMDH10* expression significantly upregulated especially under drought stress. Detached *Arabidopsis thaliana* leaves heterologously overexpressing *VvMDH10* exhibited a significantly lower water loss rate compared to wild-type plants. Under drought stress, the overexpressing lines showed significantly higher biomass and activities of antioxidant-related enzymes, significantly lower malondialdehyde (MDA) content compared to the wild type. 【Conclusion】The *VvMDH10* gene can positively regulate plant drought tolerance and can serve as a genetic resource for molecular breeding of drought-resistant grapevines.

Keywords: Marselan grape; malate dehydrogenase (MDH); *VvMDH10*; drought resistance; salt-alkali tolerance; genome-wide identification; overexpression

葡萄（*Vitis vinifera* L.）是一种在全球范围内广泛种植的重要经济果树，不仅可以直接食用，还可用于酿酒、制汁、制干等加工产业。然而，在葡萄的生长过程中，常常会受到各种逆境胁迫，如低温、干旱、盐碱以及病原菌的侵害，影响葡萄的产量和品质[1-2]。因此，深入研究葡萄的抗逆分子机制，挖掘与抗逆相关的基因资源，对于培育具有优良抗逆性的葡萄新品种具有重要意义。

苹果酸（malate）是三羧酸循环中重要中间产物[3]。苹果酸脱氢酶（malate dehydrogenase, MDH）广泛存在于动物、植物和微生物中，其以NAD^+/$NADP^+$为辅因子，催化苹果酸与草酰乙酸的可逆转化[4-6]。NAD-MDH主要存在于线粒体中，参与三羧酸循环，为细胞提供能量和碳骨架；NADP-MDH主要存在于叶绿体中，参与光合作用中的C_4和景天酸代谢途径，调节CO_2浓度和光合效率[7]。多项研究表明，高等植物的*MDH*基因家族在能量代谢、呼吸作用、活性氧代谢及植物抗逆性过程中发挥重要作用[8-11]。目前，已在拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）[12-13]、番茄（*Solanum lycopersicum*）[14]、玉米（*Zea mays*）[15]、小麦（*Triticum aestivum*）[16]、水稻（*Oryza sativa*）[17]、土豆（*Solanum tuberosum*）[18]、花生（*Arachis hypogaea*）[19]、棉花（*Gossypium hirsutum*）[20-21]、杨树（*Populus trichocarpa*）[22]、杉树（*Cunninghamia lanceolata*）[23]和苹果（*Malus domestica*）[24-26]等多个物种中对*MDH*基因进行全基因组鉴定或功能分析。在强光下，拟南芥NADP-MDH功能缺失突变体的ROS累积显著增加[27]。过量表达玉米*ZmNADP-MDH*的拟南芥植株在盐胁迫下叶绿素和脯氨酸含量增加，ROS含量降低，从而表现出耐盐性[15]。水稻*osmdh1*突变体呈现耐盐表型，而过表达转基因植株则呈现盐敏感表型[28]。过量表达苹果*MdcyMDH*能够提高苹果植株的耐寒性和耐盐性[25]。多个杉木*ClMDH*在低磷胁迫下表达上调[23]。拟南芥线粒体苹果酸脱氢酶（*mMDH2*）能够被缺铁胁迫诱导，与野生型相比，功能缺失突变体*mmdh2*对缺铁胁迫更敏感，且体内H_2O_2含量较高，而过表达植株对缺铁胁迫更耐受，H_2O_2含量更低[29]。干旱胁迫后，*MdmMDH*-RNAi转基因苹果植株叶片含水量降低[30]。综上，*MDH*基因在不同物种进化过程中发生了功能分化，因此对不同物种的*MDH*基因进行研究，有利于丰富和完善*MDH*的功能研究。

本研究从葡萄基因组中鉴定*MDH*家族基因，并对各基因的蛋白理化性质、基因同源性、染色体位置、保守基序（motif）、基因结构和启动子区域等进行分析。结合干旱和盐碱胁迫处理下的表达分析，将受干旱诱导显著上调的基因*VvMDH10*异源过表达拟南芥，探究其参与调节植株抗旱性的功能，为葡萄抗旱遗传改良提供基因资源。

1　材料与方法

1.1　材料

试验于2025年3-6月在鲁东大学北区日光温室进行，温室平均温度20-30 ℃，湿度55%-70%，每天光照时间不少于6.5 h。供试材料为一年生酿酒葡萄‘马瑟兰’（*Vitis vinifera* cv. Marselan）扦插苗。于2024年11月收集‘马瑟兰’葡萄一年生枝条，修剪成具有2个或以上完整芽的小段，插入装有泥炭

土的黑色塑料花盆中，种植深度为5-8 cm，正常水肥管理3个月，然后选取木质茎段长短粗细、长势一致的48棵葡萄苗转移到含有蛭石：珍珠岩（1∶1）的花盆中（20 cm×18 cm×20 cm），每盆种1棵，每3 d浇1次1/2改良版霍格兰营养液，每次浇1 L，待植株长到8-10片叶子时进行试验。试验设计4个处理：对照（只浇1/2霍格兰营养液）、盐胁迫处理（1/2霍格兰营养液+200 mmol/L NaCl）、碱胁迫处理（1/2霍格兰营养液+200 mmol/L $NaHCO_3$）、盐碱复合胁迫处理（1/2霍格兰营养液+100 mmol/L NaCl +100 mmol/L $NaHCO_3$）。以浇灌开始为第0小时，处理1、6和24 h后采集生长点下第3片真叶叶片，每个时间点选取3株以上植物叶片，液氮速冻后保存于-80 ℃冰箱。干旱处理为葡萄幼苗停止浇灌营养液7 d后（浇灌后基质含水量为142.1%，7 d后基质含水量为29.5%），选取3株以上植物叶片，液氮速冻后保存于-80 ℃冰箱。

1.2 方法

1.2.1 葡萄*MDH*家族成员鉴定 从TAIR（https://www.arabidopsis.org/）网站下载拟南芥MDH家族所有成员序列；从Ensembl Plants数据库（https://plants.ensembl.org/index.html）下载葡萄基因组文件（ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/plants/release-45/fasta/vitis_vinifera/，版本号：ASM3070453v1）。以拟南芥MDH蛋白序列为查询序列，在葡萄基因组蛋白数据库中BLASTP搜索，e值小于$1\times e^{-10}$，初步获得葡萄*MDH*基因。从Pfam蛋白家族数据库（http://pfam.xfam.org/）下载MDH蛋白结构域（PF00056和PF02866），使用TBtools的HMM search对候选蛋白进行分析。删除重复及冗余后，通过NCBI CDD（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）对候选蛋白是否具有完整MDH结构域进行验证，最终确定11个*VvMDH*家族成员。

1.2.2 葡萄MDH家族成员染色体定位和理化性质分析 从葡萄基因组注释信息中获得*VvMDH*基因在染色体的位置信息。利用TBtools软件绘制*VvMDH*基因的染色体分布图。通过ExPasy网站（https://web.expasy.org/protparam/）对VvMDH蛋白的分子量、等电点（pI）等理化性质进行预测分析。通过WoLF PSORT（http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html）进行VvMDH蛋白的亚细胞定位预测。

1.2.3 葡萄MDH家族系统发育树构建、基因结构及保守基序（motif）分析 通过MEGA 11[31]软件采用邻接法（neighbor-joining method）对葡萄和拟南芥的MDH成员构建系统发育树，Bootstrap设置为1 000，其他参数设置为默认值，使用Evolview（https://www.evolgenius.info/evolview/）在线网站对进化树进行美化。从葡萄基因组蛋白注释文件中获得*VvMDH*基因家族成员的外显子-内含子结构信息，使用TBtools生成基因结构图。根据氨基酸序列，利用MEME[32]在线工具（https://meme-suite.org/meme/）分析序列中的保守基序，motif预测数设定为10，其余参数默认，TBtools软件可视化生成蛋白质结构图。使用TBtools绘制VvMDH进化树、基序、基因结构分析组合图。

1.2.4 启动子顺式作用元件预测 使用TBtools提取11个*VvMDH*家族成员起始密码子上游2 000 bp的序列，使用PlantCARE[33]（https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/）进行顺式作用元件分析。将筛选后的结果导入TBtools进行可视化处理。

1.2.5 葡萄*VvMDH*表达分析 从NCBI下载已公布的葡萄（*Vitis vinifera* cv Corvina）转录组数据（GSE36128）[34]，用TBtools分析葡萄根、茎、叶、花、果实及种子中的*MDH*基因表达数据，构建基因表达热图。使用多糖多酚植物总RNA提取试剂盒（RC401，诺唯赞生物，南京）提取葡萄叶片总RNA，再使用HiSiciptII1st strand cDNA Synthesis Kit（诺唯赞生物，南京）合成第一链cDNA，置于-20 ℃保存备用。利用Primer3.0（https://primer3.ut.ee/）设计基因的引物（附表1），选择葡萄*GAPDH*作为内参基因[35]。使用SupRealQ Purple Universal SYBR qPCR Master Mix（U+）（Q412，诺唯赞生物，南京）进行定量分析。反应体系（20 μL）：2×SupRealQ Purple Universal SYBR qPCR Master Mix（U+）10 μL，上、下游引物（10 μmmol/L）各0.4 μL，cDNA模板2 μL，ddH_2O 7.2 μL。反应程序为95 ℃ 30 s；95 ℃ 10 s，60 ℃ 15 s，40个循环。每个样品进行3次生物学重复。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各基因表达量。

1.2.6　*VvMDH10*基因克隆　根据生信分析得到的*VvMDH10*基因序列信息，设计引物：*VvMDH10*F/R（附表1），下划线部分为pCambia2300载体序列，以葡萄叶片cDNA为模板，使用Phanta Flash Super-Fidelity DNA Polymerase（P521-d1，诺唯赞生物，南京）进行PCR。反应体系（20 μL）：2×Phanta Flash Buffer 10 μL，上、下游引物（10 μmmol/L）各0.4 μL，cDNA模板2 μL，Phanta Flash Super-Fidelity DNA Polymerase 0.4 μL，ddH_2O 6.8 μL。PCR反应体系如下：98 ℃预变性30 s；98 ℃变性10 s，60 ℃退火5 s，72 ℃延伸10 s，共30个循环；72 ℃终延伸1 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测后回收。pCambia2300载体经*Bam*H I和*Pst* I双酶切后胶回收，将回收的PCR产物与pCambia2300载体利用ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit V3试剂盒（C117-01，诺唯赞生物，南京）进行重组反应，重组体系为：pCambia2300载体1 μL，PCR回收产物4 μL，2×CE Mix V3 5 μL，50 ℃ 15 min。将重组产物转化到大肠杆菌DH5α感受态细胞中，涂布于含有卡那霉素的LB固体培养基上，37 ℃培养12–16 h。挑取单菌落，进行菌落PCR鉴定，阳性克隆送测序公司进行测序。

1.2.7　*VvMDH10*异源表达分析　将测序正确的VvMDH10-pCambia2300质粒转入农杆菌GV3101中，采用花序浸染法进行拟南芥遗传转化[36]，单株收获种子并在含50 mg/L卡那霉素的培养基上进行筛选。将筛选到的阳性拟南芥幼苗移栽至基质中土培3周，剪取其叶片，提取基因组DNA，以提取的DNA为模板，用载体和基因序列上的引物进行PCR扩增反应，得到目的大小条带的即为阳性植株。

1.2.8　干旱处理　在植物生长室进行实验，生长室温度（23±0.5）℃，湿度60%–70%，光照强度120 μmol/(m^2·s)。选取培养4周的拟南芥，剪下整个莲座叶，称取鲜重（M0）后放入光照培养箱中[（23±0.5）℃，湿度65%–75%，光周期16 h/8 h，光照强度100 μmol/(m^2·s)]。分别在0.5、1、2、3、4、5和6 h称重（Mt）[37]。叶片失水率（%）=(M0−Mt)/M0×100%。3个莲座叶为一组，一组3个重复。

1.2.9　过氧化物酶活性测定　分别采集正常和干旱处理下的野生型和过表达植株叶片，蒸馏水冲洗表面灰尘，液氮速冻，保存于-80 ℃冰箱。丙二醛（malondialdehyde, MDA）含量、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）、过氧化物酶（peroxidase, POD）、过氧化氢酶（catalase, CAT）活性均采用南京建成生物试剂盒测定。

1.2.10　数据处理　本研究数据采用Microsoft Excel 2017进行整理，用SPSS 2025软件对数据差异的显著性进行Duncan多重比较法分析，并用SigmaPlot 15.0作图。

2　结果

2.1　*VvMDH*基因理化性质及染色体定位分析

在葡萄基因组中鉴定出11个*MDH*基因，根据其在染色体上的顺序进行命名（*VvMDH1*–*VvMDH11*）（附表2）。理化性质分析显示，11个VvMDH蛋白长度为332–437个氨基酸，分子量为35.5–48.1 kD，等电点为5.76–8.79，多为碱性蛋白。亚细胞定位预测表明，VvMDH分布于叶绿体（6个）、细胞质基质（3个）和线粒体（2个）。染色体定位分析显示，11个葡萄*MDH*基因不均匀分布于9条染色体上，其中第7染色体和第15染色体上含有2个*VvMDH*，其余均只有1个*VvMDH*（图1）。

2.2　*VvMDH*基因系统发育分析

为研究葡萄*MDH*家族的系统进化关系，构建拟南芥（9个）、水稻（12个）、番茄（12个）、杨树（15个）和葡萄（11个）*MDH*的系统发育树。结果（图2）显示，*VvMDH*与*AtMDH*聚类模式一致，进化树分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ5个分支，Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ均包含2个*VvMDH*家族成员，Ⅱ包含3个*VvMDH*家族成员。在Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ亚族中，拟南芥和葡萄MDH蛋白同源性很高，Ⅰ、Ⅳ亚族中拟南芥和葡萄MDH蛋白有较显著区分。

2.3　*VvMDH*基因结构及蛋白保守基序分析

利用MEME在线工具分析VvMDH蛋白序列中的保守基序，结果（图3）显示，VvMDH蛋白的基序种类和数量在亚家族间存在差异，而在亚家族内部则一致性较高。VvMDH蛋白中存在3–9个保守基序，其中Motif 1、Motif 4、Motif 5在所有VvMDH蛋白中均存在。

使用TBtools对*VvMDH*基因的外显子和内含子结构进行分析和可视化。结果显示，同一亚族的

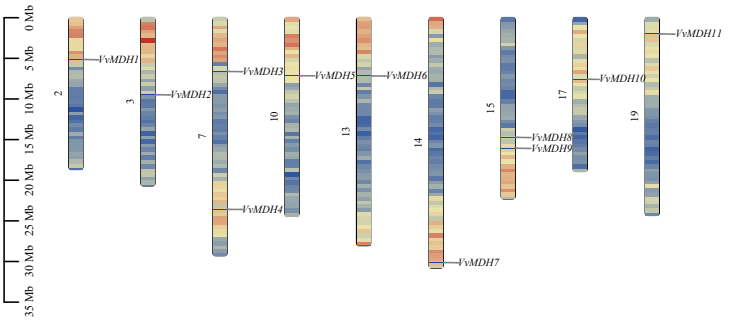


图1 *VvMDH*基因染色体定位

Fig. 1 Chromosome localization of *VvMDH* genes in grape

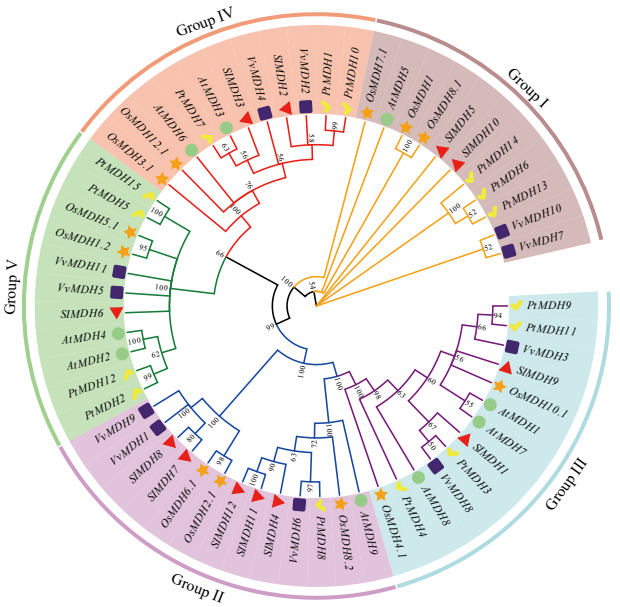


图2 葡萄(Vv)、拟南芥(At)、水稻(Os)、番茄(Sl)和杨树(Pt)MDH蛋白系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of MDH proteins in *Vitis vinifera* (Vv), *Arabidopsis thaliana* (At), *Oryza sativa* (Os), *Solanum lycopersicum* (Sl) and *Populus trichocarpa* (Pt)

*VvMDH*家族成员基因结构相似，不同亚族间存在较大差异。除*VvMDH2*和*VvMDH9*以外的所有基因均有5′或3′的非编码区（UTR）。*VvMDH7*和*VvMDH10*只有1个外显子，*VvMDH1*和*VvMDH9*有2个外显子，其他*VvMDH*基因均含有7个或7个以上外显子，其中*VvMDH6*外显子最多（14个）。*VvMDH9*基因序列最短（1 308 bp），而*VvMDH3*基因序列最长（15 414 bp）。以上分析暗示不同*VvMDH*功能可能存在差异。

2.4 *VvMDH*基因顺式作用元件分析

为探究*VvMDH*基因的潜在生物学功能，本研究截取*VvMDH*基因上游2 000 bp序列，将该序列视为启动子区，对该区域的顺式作用元件进行分析，结果（图4）显示，*VvMDH*启动子除了含有多个TATA盒和CAAT盒外，大多数基因含有参与干旱（MBS）、低温（LTR）、缺氧（AI）及外伤（DSR）等非生物胁迫相关的顺式作用元件，其中*VvMDH4/6/8/10*分别含有1、1、2和2个MBS元件；所有*VvMDH*都含有参与光响应（LRE）的顺式作用元件。此外，在11个*VvMDH*的启动子中还发现参与植物激素响应的顺式作用元件，如赤霉素（GRE）、脱落酸（ABRE）、生长素（Auxin）、茉莉酸（JA）、水杨酸（SA），其中*VvMDH4/6/8/10/11*分别含有2、1、2、2和1个ABRE元件，表明这些基因可能参与ABA介导的植物响应干旱、高盐、低温等非生物胁迫或生物胁迫过程。*VvMDH*基因响应元件的多样性表明这些基因可能参与多种生理和生物学过程。

2.5 *VvMDH*基因在不同组织中的表达模式分析

为进一步分析*VvMDH*在葡萄生长发育过程中的作用，通过转录组数据分析葡萄根、茎、叶、花、果实及种子中11个*VvMDH*基因的表达情况。*VvMDH3*和*VvMDH5*在整个葡萄植株中都有较强的表达，而*VvMDH4*和*VvMDH9*的表达较弱。*VvMDH8*在果实（包括果皮、果肉和种子）中的表达水平较高，而在绿色组织（如嫩茎、嫩叶、成熟叶、卷须）中的表达水平较低；除了根部和果肉，*VvMDH6*在其他组织中的表达水平都较高；*VvMDH1*在根中的表达较高；*VvMDH2*在叶片中的表达水平最高；*VvMDH10*

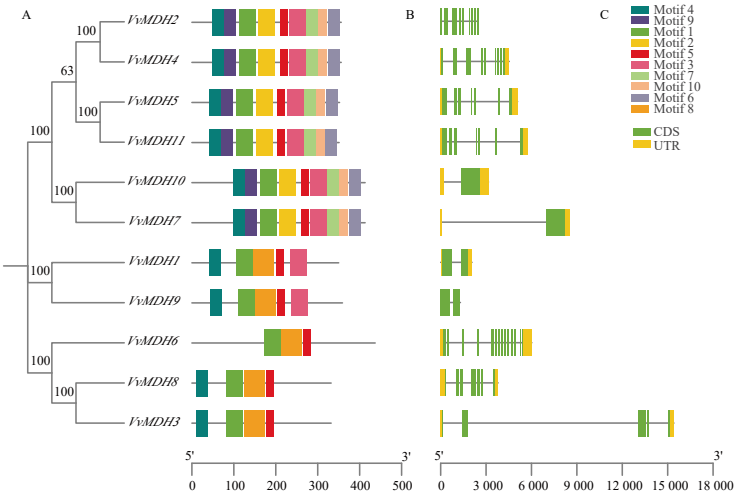


图3　*VvMDH*基因系统进化树(A)、基因结构(B)和蛋白保守基序(C)

Fig. 3　Phylogenetic tree (A), gene structure (B), and protein conserved motif (C) of *VvMDH* gene family

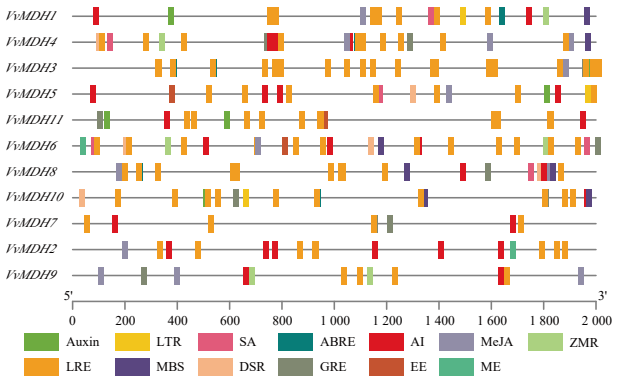


图4　*VvMDH*启动子区顺式作用元件分析

Fig. 4　Analysis of *cis*-acting elements in the promoter region of *VvMDH*

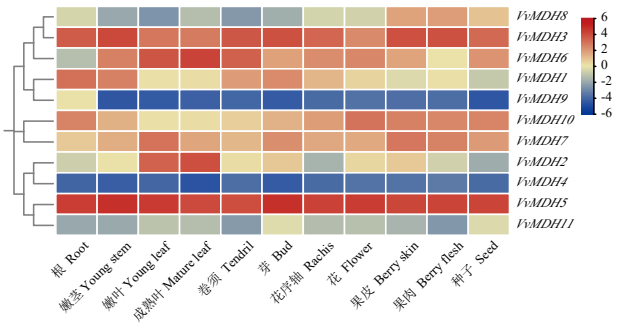


图5　*VvMDH*基因在不同组织中的表达分析

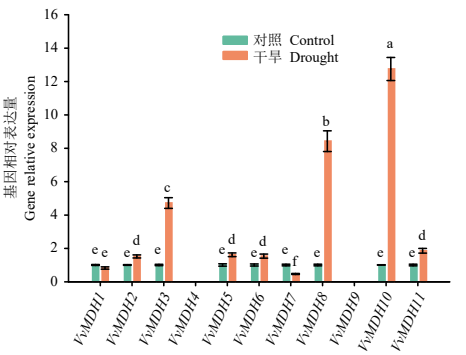
Fig. 5　Expression analysis of *VvMDH* in different tissues of grape

在根、花及果实中的表达较高；*VvMDH7*在叶片、芽和果实中的表达较高（图5）。

2.6　*VvMDH*基因在干旱和盐碱胁迫处理下的表达模式分析

分析葡萄叶片中*MDH*基因对干旱和盐碱的响应，除*VvMDH4*和*VvMDH9*在所有处理、所有时间点都不表达外，其余*VvMDH*基因的表达水平呈现不同的变化趋势（图6）。

停止浇水7 d后，*VvMDH3/8/10*的表达量分别上升到对照的4.7倍、8.4倍和12.8倍；而*VvMDH7*的表达受到抑制（下降到对照的47.6%），其他基因没有受到明显的影响（图6）。



不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。下同

Different lower letters indicate significant differences (P<0.05). The same below

图6　*VvMDH*基因在干旱处理下的相对表达量

Fig. 6　Relative expression of *VvMDH* genes under drought treatments

VvMDH1/2/5/11 均受盐、碱及盐碱复合处理的诱导（图7）。处理24 h后，*VvMDH2* 的表达量分别上升到对照的5.8倍（盐处理）、3.9倍（碱处理）和8.4倍（盐碱处理）；*VvMDH11* 的表达量分别上升到对照的8.5倍（盐处理）、12.5倍（碱处理）和15.3倍（盐碱处理）。*VvMDH7* 和 *VvMDH10* 的表达变化较为复杂，具体表现为：盐、碱及盐碱复合处理1 h后，*VvMDH7* 的表达分别下降到对照的41.2%（盐）、67.4%（碱）、36.3%（盐碱）；24 h后，其表达又上升到对照的1.4倍（盐处理）、1.8倍（碱处理）或恢复到正常表达水平（盐碱处理）。盐处理后，*VvMDH10* 的表达水平呈现先上升又下降的趋势，而碱处理和盐碱处理后该基因均呈现先下降又上升的趋势。其他基因的表达变化不明显。

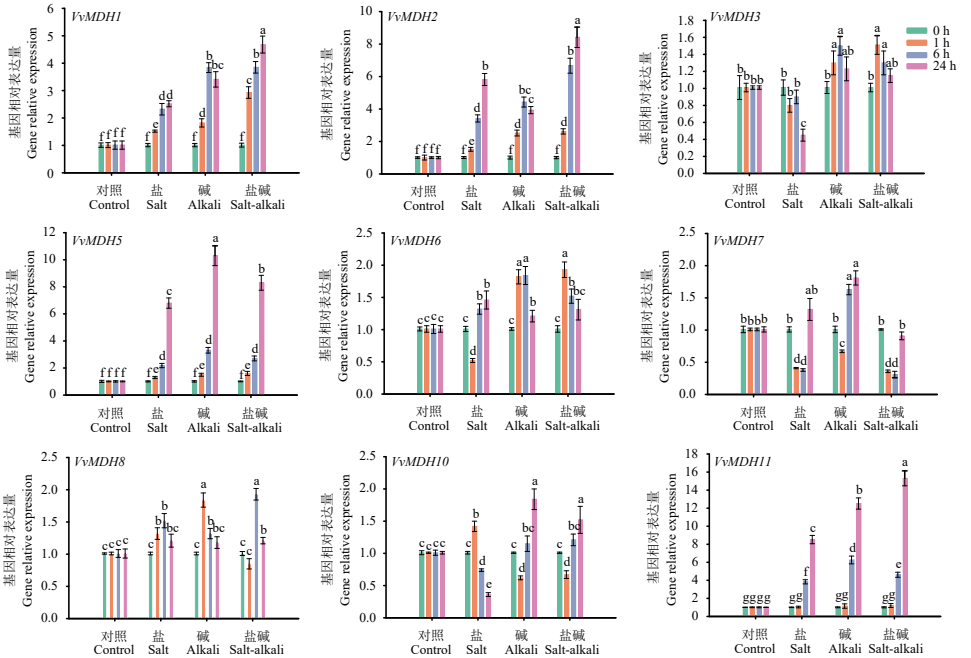


图7 *VvMDH* 基因在盐碱处理下的相对表达量

Fig. 7 Relative expression of *VvMDH* genes under salt-alkali treatments

2.7 *VvMDH10* 基因在拟南芥中过表达分析

将 *VvMDH10* 转入拟南芥Col-0，建立过表达株系，通过荧光定量PCR，鉴定 *VvMDH10* 在Col-0中的表达量，结果（图8）显示，在野生型拟南芥中，*VvMDH10* 几乎没有表达，而在转基因植株中，*VvMDH10* 均有较高表达，在多个株系中，OE#4和OE#7的表达量较高，因此本试验选用OE#4和OE#7用于后续分析。

2.8 过表达 *VvMDH10* 增强拟南芥植株抗旱能力

将拟南芥野生型及过表达株系置于含有泥炭土的营养钵中培养4周，先将整个营养钵充分灌水，然后停止浇水，观测植物干旱胁迫下的表型。3–4周后，野生型拟南芥叶片出现萎蔫，且叶片失绿，荚果减少，基本停止生长（图9-A）；而同样受到干旱处理的过表达株系，叶片仍保持膨压，叶片依旧呈

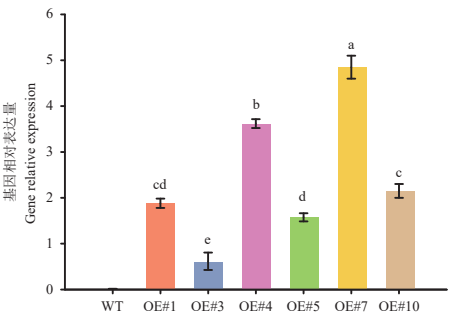
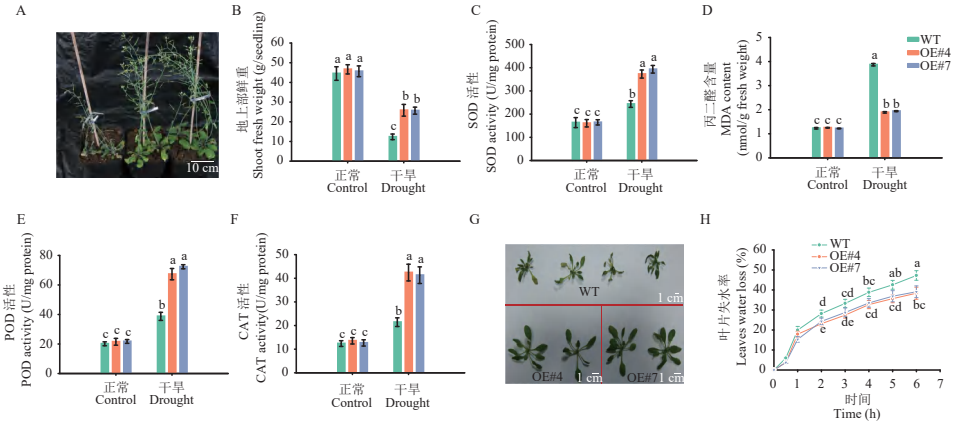


图8 *VvMDH10* 在转基因拟南芥中的相对表达量

Fig. 8 Relative expression of *VvMDH10* in transgenic *A. thaliana*



将拟南芥野生型及过表达株系置于含有泥炭土的营养钵中培养4周，先将整个营养钵充分灌水，然后停止浇水，观测植物干旱处理前后的表型，测定丙二醛含量和多种酶活性。后将拟南芥野生型及过表达株系置于含有泥炭土的营养钵中培养4周，分别剪取其整个莲座叶，置于培养皿中，放入光照培养箱，每隔一段时间称取其鲜重。A：植株表型；B：地上部鲜重；C：SOD活性；D：丙二醛含量；E：POD活性；F：CAT活性；G：叶片失水表型；H：叶片失水率统计；图B–F、H中数据为平均值±标准差

Arabidopsis thaliana wild-type and overexpression lines were grown in pots containing peat soil for 4 weeks. The entire pots were fully watered first, then watering was stopped. The phenotypes of the plants before and after drought treatment were observed, and MDA content and activities of various enzymes were determined. Then the *Arabidopsis thaliana* wild-type and overexpression lines were grown in pots containing peat soil for 4 weeks, and their entire rosette leaves were cut separately, placed in petri dishes, and put into an illumination incubator. The fresh weight was measured at regular intervals. A: Plant phenotype. B: Shoot fresh weight. C: SOD activity. D: MDA content. E: POD activity. F: CAT activity. G: Leaf water loss phenotype. H: Statistical analysis of leaf water loss rate. Data in Figures B–F and H are presented as mean ± standard deviation

图9　干旱胁迫下*VvMDH10*异源过表达转基因拟南芥的表型和生理指标比较

Fig. 9　Comparisons of phenotype and physiological indices in *VvMDH10*-overexpressing *Arabidopsis* under drought stress

绿色，荚果较多，仍能继续生长，其地上部鲜重为野生型的2.0倍（图9-B），表明*VvMDH10*能够增强拟南芥对干旱的耐受能力。进一步测定植株的丙二醛（MDA）含量及SOD、POD和CAT酶活性，结果显示（图9-C–F），正常生长条件下，野生型和转基因植株的上述指标基本一致。干旱处理后，所有植株的MDA含量及SOD、POD和CAT酶活性均有所提高。不同的是，干旱处理下野生型拟南芥MDA含量上升到正常生长条件下的3.1倍，而转基因植株仅上升到1.5–1.6倍；野生型植株的SOD、POD和CAT活性分别上升到正常生长条件下的1.5倍、1.9倍和1.7倍，而转基因植株上升到2.4倍、3.2倍和3.2倍。

剪取生长约4周的野生型和转基因拟南芥莲座叶，置于培养皿中，放入光照培养箱，每隔一段时间称取其重量。与野生型相比，过表达株系水分散失相对较少（图9-G、H），表明过表达*VvMDH10*能够减少拟南芥的水分散失。

3　讨论

有机酸普遍存在于所有植物中，不同的植物种类、相同植物不同的发育阶段和不同的组织类型，其体内有机酸的种类及积累量存在差异[38]。苹果酸是葡萄中最主要的有机酸之一，在体内参与多种生物学功能[39]。苹果酸脱氢酶（*MDH*）基因介导苹果酸向草酰乙酸的可逆转化，在能量平衡、植物发育和耐盐性中起着至关重要的作用。研究显示，植物*MDH*基因在应对寒冷[24–25]、盐胁迫[14–15, 17, 24–25]、低磷胁迫[23]、锰毒害[19]及铝毒[40]等非生物胁迫中起着重要作用，但干旱和盐碱胁迫下的*MDH*基因家族尚未得到系统的研究。

本研究对葡萄*MDH*基因家族成员进行基因组鉴定、理化性质分析、染色体定位、基因结构及保守基序（Motif）分析、启动子区顺式作用元件分析等详细的生物信息学分析。共鉴定出11个*VvMDH*基因。该家族基因与拟南芥MDH蛋白构建系统发育树后聚类模式一致，表明两者亲缘关系可能较近。

*VvMDH*基因间外显子总数差异较大，第Ⅰ组基因（*VvMDH7*和*VvMDH10*）只含有1个外显子，这与番茄[14]和杨树[22]中的结果一致。

*VvMDH*基因存在组织特异性表达，在葡萄营养部位（根、茎、叶和卷须）表达的*MDH*多于在生殖器官（花和果实）中的，*MDH*在葡萄不同组织的表达暗示其在植物生长发育中具有不同的功能。特别是*VvMDH2*仅在叶片中特异性表达，同时亚细胞定位显示该蛋白定位于叶绿体中，表明该基因可能参与葡萄叶片叶绿体苹果酸脱氢酶功能的行使。

植物受到干旱[41-42]、盐碱[43-44]等非生物胁迫时，体内会产生H_2O_2、O_2^-和OH^-等活性氧（ROS），细胞能够启动酶促系统或非酶促系统清除ROS。本研究结果显示，3个*MDH*（*VvMDH3/8/10*）的表达受到干旱胁迫的诱导，这与顺式作用元件分析结果一致。大多数*VvMDH*基因的表达受到盐胁迫的诱导，这与水稻[17]、番茄[14]及杨树[22]中的结果一致。此外，*VvMDH1/2/5/11*还受碱及盐碱复合处理的诱导，其他物种中的*MDH*是否能够响应碱胁迫，还有待进一步验证。过量表达*VvMDH10*增强拟南芥植株的抗旱能力，表现为与野生型相比，叶片失水率降低，干旱胁迫后生物量较高。这与苹果中的结果一致，干旱处理9 d后，苹果*MdmMDH*-RNAi转基因植株叶片的相对含水量明显低于野生型[30]。干旱处理后，转基因拟南芥体内MDA、SOD、POD、CAT等与抗旱及活性氧清除相关的指标均增强，这与过量表达苹果*MDH*能够增强转基因愈伤的SOD和CAT活性一致[24]。多个花生*MDH*基因的表达受到锰胁迫的诱导[19]，植物受到锰毒害后体内抗氧化相关酶活增强[45]。VvMDH10可能催化产生的NAD^+，进入叶绿体等细胞器，通过转氢作用间接促进NADPH的生成[15]。NADPH是植物核心抗氧化系统——抗坏血酸-谷胱甘肽循环必需的还原力来源，该循环中的关键酶如单脱氢抗坏血酸还原酶（MDHAR）等直接依赖NADPH。充足的NADPH能保障抗坏血酸和谷胱甘肽处于还原态，使整个循环高效运转，及时清除干旱胁迫下过量积累的活性氧，保护膜脂、蛋白质和核酸免受氧化[46-47]。拟南芥*MDH*敲除突变体ROS积累显著增强[27]。苹果*MdcyMDH*转录水平受到轻度冷和盐处理诱导，过表达该基因的苹果植株相比野生型呈现出更强的耐寒性和耐盐性，并且过表达转基因植株在正常及胁迫条件下（尤其是胁迫条件下）体内抗坏血酸、谷胱甘肽、H_2O_2和水杨酸含量增加，表明MdcyMDH通过增强还原型氧化还原态并提升水杨酸水平，赋予转基因苹果植株更高的胁迫耐受性[25]，而本文过量表达*VvMDH10*也能够提高转基因拟南芥的抗氧化酶活性，其两者的内在机制可能类似，但还需进一步试验验证。以上结果表明，*VvMDH10*可能通过活性氧信号调节植物对干旱的响应，下一步将利用转录组学和代谢组学，鉴定转基因植株中关键活性氧靶向的离子通道或调控蛋白，进一步揭示VvMDH10参与活性氧信号与其他信号分子（如ABA，Ca^{2+}）的互作网络。

4 结论

从葡萄基因组中鉴定出11个*MDH*基因，不均匀地分布在9条染色体上，共分为5个亚家族。多个*VvMDH*基因的表达受到干旱和盐碱胁迫的诱导，过量表达*VvMDH10*能够提高转基因拟南芥植株抗旱性。

文章所有附表数据请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260423135852_NewsFile_31.pdf）

参考文献

[1] Jiao SZ, Zeng FW, Huang YP, et al. Physiological, biochemical and molecular responses associated with drought tolerance in grafted grapevine [J]. BMC Plant Biol, 2023, 23: 110.

[2] Rienth M, Vigneron N, Darriet P, et al. Grape berry secondary metabolites and their modulation by abiotic factors in a climate change scenario-a review [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 643258.

[3] Fernie AR, Martinoia E. Malate. Jack of all trades or master of a few [J]. Phytochemistry, 2009, 70(7): 828-832.

[4] Cosse M, Rehders T, Eirich J, et al. Cysteine oxidation as a regulatory mechanism of *Arabidopsis* plastidial NAD-dependent malate dehydrogenase [J]. Physiol Plant, 2024, 176(3): e14340.

[5] Baird LM, Berndsen CE, Monroe JD. Malate dehydrogenase in plants: evolution, structure, and a myriad of functions [J]. Essays Biochem, 2024, 68(2): 221-233.

[6] Martinez-Vaz BM, Howard AL, Jamburuthugoda VK, et al. Insights into the regulation of malate dehydrogenase: inhibitors, activators, and allosteric modulation by small molecules [J]. Essays Biochem, 2024, 68(2): 173-181.

[7] Hebbelmann I, Selinski J, Wehmeyer C, et al. Multiple strategies

to prevent oxidative stress in *Arabidopsis* plants lacking the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase [J]. J Exp Bot, 2012, 63(3): 1445-1459.

[8] Liu J, Wang XC, Guan ZY, et al. The LIKE SEX FOUR 1-malate dehydrogenase complex functions as a scaffold to recruit β-amylase to promote starch degradation [J]. Plant Cell, 2023, 36(1): 194-212.

[9] Yokochi Y, Yoshida K, Hahn F, et al. Redox regulation of NADP-malate dehydrogenase is vital for land plants under fluctuating light environment [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(6): e2016903118.

[10] Talla SK, Sunil B, Rao DE, et al. Redox basis of photosynthesis inhibition at supra-optimal bicarbonate in mesophyll protoplasts of *Arabidopsis thaliana* [J]. J Plant Physiol, 2023, 287: 154047.

[11] Balparda M, Elsässer M, Badia MB, et al. Acetylation of conserved lysines fine-tunes mitochondrial malate dehydrogenase activity in land plants [J]. Plant J, 2022, 109(1): 92-111.

[12] Selinski J, König N, Wellmeyer B, et al. The plastid-localized NAD-dependent malate dehydrogenase is crucial for energy homeostasis in developing *Arabidopsis thaliana* seeds [J]. Mol Plant, 2014, 7(1): 170-186.

[13] Beeler S, Liu HC, Stadler M, et al. Plastidial NAD-dependent malate dehydrogenase is critical for embryo development and heterotrophic metabolism in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2014, 164(3): 1175-1190.

[14] Imran M, Munir MZ, Ialhi S, et al. Identification and characterization of malate dehydrogenases in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 10028.

[15] Kandoi D, Mohanty S, Tripathy BC. Overexpression of plastidic maize NADP-malate dehydrogenase (ZmNADP-MDH) in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to salt stress [J]. Protoplasma, 2018, 255(2): 547-563.

[16] Ding Y, Ma QH. Characterization of a cytosolic malate dehydrogenase cDNA which encodes an isozyme toward oxaloacetate reduction in wheat [J]. Biochimie, 2004, 86(8): 509-518.

[17] Zhang YH, Wang YL, Sun XM, et al. Genome-wide identification of *MDH* family genes and their association with salt tolerance in rice [J]. Plants, 2022, 11(11): 1498.

[18] Li ZQ, Shi L, Lin XJ, et al. Genome-wide identification and expression analysis of malate dehydrogenase gene family in sweet potato and its two diploid relatives [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(23): 16549.

[19] Liu Y, Zhao M, Shi JN, et al. Genome-wide identification of *AhMDHs* and analysis of gene expression under manganese toxicity stress in *Arachis hypogaea* [J]. Genes, 2023, 14(12): 2109.

[20] Imran M, Tang K, Liu JY. Comparative genome-wide analysis of the malate dehydrogenase gene families in cotton [J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166341.

[21] Imran M, Zhang B, Tang K, et al. Molecular characterization of a cytosolic malate dehydrogenase gene (*GhcMDH1*) from cotton [J]. Chem Res Chin Univ, 2017, 33(1): 87-93.

[22] Chen XH, Zhang J, Zhang C, et al. Genome-wide investigation of malate dehydrogenase gene family in poplar (*Populus trichocarpa*) and their expression analysis under salt stress [J]. Acta Physiol Plant, 2021, 43(2): 28.

[23] Lin YW, Chen WT, Yang Q, et al. Genome-wide characterization and gene expression analyses of malate dehydrogenase (*MDH*) genes in low-phosphorus stress tolerance of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(5): 4414.

[24] Yao YX, Dong QL, Zhai H, et al. The functions of an apple cytosolic malate dehydrogenase gene in growth and tolerance to cold and salt stresses [J]. Plant Physiol Biochem, 2011, 49(3): 257-264.

[25] Wang QJ, Sun H, Dong QL, et al. The enhancement of tolerance to salt and cold stresses by modifying the redox state and salicylic acid content via the *cytosolic malate dehydrogenase* gene in transgenic apple plants [J]. Plant Biotechnol J, 2016, 14(10): 1986-1997.

[26] Ma BQ, Yuan YY, Gao M, et al. Genome-wide identification, classification, molecular evolution and expression analysis of malate dehydrogenases in apple [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): 3312.

[27] Heyno E, Innocenti G, Lemaire SD, et al. Putative role of the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase in H_2O_2 signalling in *Arabidopsis* [J]. Phil Trans R Soc B, 2014, 369(1640): 20130228.

[28] Nan N, Wang J, Shi YJ, et al. Rice plastidial NAD-dependent malate dehydrogenase 1 negatively regulates salt stress response by reducing the vitamin B6 content [J]. Plant Biotechnol J, 2020, 18(1): 172-184.

[29] 朱香豫．*mMDH2*基因在调控拟南芥缺铁响应中的功能分析[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2021.
Zhu XY. Analyzing on the function of *mMDH2* in response to iron deficiency in *Arabidopsis thaliana* [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2021.

[30] 崔晓慧．苹果*MdmMDH*和*MdNADP-MDH-like*基因的功能分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
Cui XH. Functional analysis of *MdmMDH* and *MdNADP-MDH-like* genes in *Malus* [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2021.

[31] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Mol Biol Evol, 2016, 33(7): 1870-1874.

[32] Bailey TL, Boden M, Buske FA, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37 (suppl_2): W202-W208.

[33] Lescot M, Déhais P, Thijs G, et al. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(1): 325-327.

[34] Fasoli M, Dal Santo S, Zenoni S, et al. The grapevine expression atlas reveals a deep transcriptome shift driving the entire plant into a maturation program [J]. Plant Cell, 2012, 24(9): 3489-3505.

[35] 付东艳, 汪蕾, 张龙生. 遮阳对马瑟兰葡萄花色苷组分及合成相关基因表达的影响 [J]. 果树学报, 2025, 42(1): 30-47.
Fu DY, Wang L, Zhang LS. Effects of sun shading on anthocyanin components and the expression of genes related to anthocyanin synthesis in Marselan grape [J]. J Fruit Sci, 2025, 42(1): 30-47.

[36] Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 1998, 16(6): 735-743.

[37] Li JL, Han L, Su YH, et al. Functional identification of *Ammopiptanthus mongolicus* anion channel AmSLAC1 involved in drought induced stomata closure [J]. Plant Physiol Biochem, 2019, 143: 340-350.

[38] Ludwig M. The roles of organic acids in C_4 photosynthesis [J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 647.

[39] Reshef N, Karn A, Manns DC, et al. Stable QTL for malate levels in ripe fruit and their transferability across *Vitis* species [J]. Hortic Res, 2022, 9: uhac009.

[40] Tesfaye M, Temple SJ, Allan DL, et al. Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum [J]. Plant Physiol, 2001, 127(4): 1836-1844.

[41] Wang JY, Li CN, Li L, et al. Exploitation of drought tolerance-related genes for crop improvement [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(19): 10265.

[42] 刘升学, 马爱芳, 秦峰, 等. 植物抗旱性研究进展 [J]. 科学通报, 2025, 70(25): 4297-4314.
Liu SX, Ma AF, Qin F, et al. Research advances in plant drought resistance [J]. Chin Sci Bull, 2025, 70(25): 4297-4314.

[43] van Zelm E, Zhang YX, Testerink C. Salt tolerance mechanisms of plants [J]. Annu Rev Plant Biol, 2020, 71: 403-433.

[44] Zhang HL, Yu FF, Xie P, et al. A Gγ protein regulates alkaline sensitivity in crops [J]. Science, 2023, 379(6638): eade8416.

[45] 刘秀春, 陈丽楠, 王炳华, 等. 锰胁迫对不同砧木苹果幼树锰吸收分配及抗氧化系统的影响 [J]. 园艺学报, 2013, 40(10): 1877-1886.
Liu XC, Chen LN, Wang BH, et al. Effects of Mn stress on Mn uptakes and antioxidant system of young apple trees of different rootstocks [J]. Acta Hortic Sin, 2013, 40(10): 1877-1886.

[46] Zhao YN, Luo LL, Xu JS, et al. Malate transported from chloroplast to mitochondrion triggers production of ROS and PCD in *Arabidopsis thaliana* [J]. Cell Res, 2018, 28(4): 448-461.

[47] 王福祥, 肖开转, 姜身飞, 等. 干旱胁迫下植物体内活性氧的作用机制 [J]. 科学通报, 2019, 64(17): 1765-1779.
Wang FX, Xiao KZ, Jiang SF, et al. Mechanisms of reactive oxygen species in plants under drought stress [J]. Chin Sci Bull, 2019, 64(17): 1765-1779.

（责任编辑　高洁）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):153-159

过表达葡萄*VaHY5*基因增强拟南芥低温胁迫耐受性

薛孟孟 耿艺轩 韩煦乐 杨始锦*
（宁夏大学葡萄酒与园艺学院，银川 750021）

摘 要： 【目的】探究葡萄*VaHY5*基因抗寒功能，为培育具有优良抗寒性状的葡萄新种质提供基因资源和理论依据。【方法】通过农杆菌介导的花序浸染法在拟南芥中异源过表达*VaHY5*基因，在-6 ℃低温胁迫下观察野生型（WT）和转基因株系的表型，测定H_2O_2和$O_2^{\cdot-}$含量、抗氧化酶活性及膜损伤相关指标，并通过RT-qPCR检测相关抗寒基因的相对表达量变化。【结果】在-6 ℃低温胁迫下，过表达*VaHY5*株系的生长状态明显优于WT；过表达株系叶绿素荧光比WT更为明显，*Fv*/*Fm*值超过0.62，比WT高0.14以上。DAB和NBT染色结果显示，低温胁迫后3个过表达株系比WT颜色更浅，过表达植株H_2O_2和$O_2^{\cdot-}$含量比WT低，与染色结果一致。过表达植株的可溶性糖含量及抗氧化酶活性均高于WT，但相对电导率（REL）、丙二醛（MDA）含量均低于WT，表明过表达株系细胞膜损伤程度减轻。此外，*VaHY5*过表达显著诱导了低温胁迫下*AtCBF2*（C-repeat binding factor 2）、*AtCBF3*（C-repeat binding factor 3）、*AtCOR15a*（cold-regulated 15a）和*AtCOR47*（cold-regulated 47）的表达，*AtCBF2*和*AtCOR47*的表达量是WT的2倍左右，*AtCBF3*和*AtCOR15a*的表达量约是WT的3-4倍，表明*VaHY5*可能通过激活CBF-COR抗寒通路增强拟南芥的低温耐受性。【结论】过表达*VaHY5*通过增强活性氧（ROS）的清除能力，提高抗氧化酶的活性和可溶性糖的含量，上调冷胁迫相关基因*CBFs*和*CORs*的表达，增强转基因拟南芥对低温胁迫的耐受性。

关键词： *VaHY5*；过表达；拟南芥；低温胁迫；葡萄；CBF-COR通路；抗寒性
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1326

Overexpression of *VaHY5* Gene from *Vitis amurensis* Enhances Tolerance to Cold Stress in *Arabidopsis thaliana*

XUE Meng-meng GENG Yi-xuan HAN Xu-le YANG Shi-jin*
（*College of Enology and Horticulture, Ningxia University, Yinchuan* 750021）

Abstract: 【Objective】The aim is to explore the function of the *VaHY5* gene from *Vitis amurensis* in response to low-temperature stress, providing genetic resources and a theoretical basis for the breeding of new grape varieties with enhanced cold resistance. 【Method】*VaHY5* was overexpressed in *Arabidopsis thaliana* via *Agrobacterium*-mediated floral dip method. Under -6 ℃ cold stress, the phenotypes of wild-type (WT) and transgenic lines were observed. The contents of H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$, antioxidant enzyme activities, and membrane damage-related indicators were measured, and the relative expression levels of cold-tolerance genes were detected by RT-qPCR. 【Result】Under low-temperature stress at -6 ℃, the growth status of the *VaHY5* overexpressing line was significantly superior to that of the wild-type (WT); chlorophyll fluorescence in the overexpressing line was more pronounced than in WT, and the *Fv*/*Fm* ratio exceeded 0.62, which was 0.14 higher than the WT. DAB and NBT staining results showed that the three overexpressing lines exhibited lighter coloration than the WT after cold stress. The H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$ contents in the overexpressing plants were lower than those in the WT, consistent with the staining results. The soluble sugar content and antioxidant enzyme activities in the overexpressing plants were higher than those in the WT, but the relative electrical conductivity (REL) and malondialdehyde (MDA) content were lower than those in the WT. The results indicate that the degree of cell membrane damage in the overexpressing line was significantly reduced. Furthermore, *VaHY5* overexpression significantly induced the

收稿日期：2025-12-05
基金项目：国家自然科学基金项目（32560703），宁夏自然科学基金项目（2023AAC03067），宁夏回族自治区重点研发计划项目（2025BBF02019），宁夏大学研究生创新项目（CXXM2025069）
*通信作者：杨始锦 yangsj@nxu.edu.cn

expression of *AtCBF2* (C-repeat binding factor 2), *AtCBF3* (C-repeat binding factor 3), *AtCOR15a* (cold-regulated 15a), and *AtCOR47* (cold-regulated 47) under low-temperature stress. The expression levels of *AtCBF2* and *AtCOR47* were approximately doubled compared to the wild-type (WT), while those of *AtCBF3* and *AtCOR15a* were about 3-4 times higher than the WT. This suggests that *VaHY5* may enhance cold tolerance of *Arabidopsis* by activating the CBF-COR cold response pathway.【Conclusion】Overexpression of *VaHY5* enhances the scavenging of reactive oxygen species (ROS), increases the activity of antioxidant enzymes and the content of soluble sugars, and upregulates the expression of cold-stress-related genes (*CBFs* and *CORs*), thereby improving the tolerance of transgenic *Arabidopsis* to cold stress.

Keywords: *VaHY5*; overexpression; *Arabidopsis*; low-temperature stress; grape; CBF-COR pathway; cold resistance

葡萄（*Vitis* spp.）作为全球广泛栽培的重要经济果树之一，其生长发育易受低温影响。在我国北方地区，冬季严寒常导致葡萄发生冻害，为确保安全越冬，每年需耗费大量人力物力进行埋土防寒，制约了葡萄产业的可持续发展[1]。因此探究葡萄响应低温胁迫的机制对于葡萄抗寒育种和栽培具有重要意义，相关基因功能验证也可为葡萄品种抗性改良和新品种培育提供重要理论依据。

研究发现，WRKY、MYB等多种转录因子在植物低温胁迫响应中发挥调控作用[2-4]，通过介导下游抗寒基因表达、清除活性氧、维持细胞膜稳定性等途径增强植物耐冷性。在葡萄中，已鉴定并解析了多个抗寒相关基因的功能。如*VaWRKY65*通过可溶性糖和活性氧的“双调控”途径增强葡萄抗寒性[5]；*VaMYB4a*通过磷酸化依赖的方式，抑制*VaPIF3*和激活*VaCBF4*，正向调控葡萄的冷应激响应[6]。CBF-COR通路是低温信号传递的核心模块，CBF转录因子可识别*COR*基因启动子的CRT/DRE元件并激活其转录，修复膜损伤、稳定渗透压[7-8]。目前在葡萄中发现了6个*CBF*基因，*VvCBF2*、*VvCBF3*、*VvCBF4*和*VvCBF6*的表达可以被低温诱导[9]。

HY5作为bZIP家族的重要成员[10]，最初被鉴定为光形态建成的关键正调控因子，通过结合靶基因启动子的G-box元件，广泛参与植物光信号传导、色素合成及激素信号交叉调控[11-13]。近年来，HY5在植物抵抗低温胁迫中的功能逐渐被揭示，且在不同物种中呈现保守的抗寒调控作用。例如，番茄（*Solanum lycopersicum* L.）*SlHY5*通过整合光、温度与激素信号来正向调控番茄低温耐受性[14-16]。长豇豆（*Vigna unguiculata* L.）*VunHY5*在低温胁迫下通过*HY5-MED2-ERD14*级联正向调控耐冷性[17]。葡萄中bZIP转录因子已被充分鉴定。尽管*VvbZIP22*通过增加*VvFLS1*活性来增强槲皮素合成，促进ROS的清除，进而增强葡萄的抗寒性[18]，但葡萄bZIPs在冷胁迫响应中的功能仍不清晰。因此，山葡萄中bZIP基因*HY5*在抗寒应答中的功能对葡萄抗寒遗传规律研究及抗寒葡萄新种质的培育至关重要。

本研究通过农杆菌介导的花序浸染法获得*VaHY5*过表达拟南芥，观察其在低温胁迫下表型、生理生化指标变化以及抗寒相关基因的表达量变化，深入探究低温胁迫条件下*VaHY5*过表达拟南芥的抗寒特性。研究结果将为阐明葡萄*VaHY5*基因的耐低温分子机制提供新见解，同时也为基因工程技术定向培育耐低温葡萄品种提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用拟南芥［*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.］为Columbia（Col-0），播种于营养土（草炭∶蛭石=3∶1）中，在温度为18-22 ℃，光周期为16 h/8 h，光照强度为12 000 lx，湿度为75%的人工气候箱中培养。

1.2 方法

1.2.1 拟南芥转化与检测 用含有重组质粒pCAMBIA2300-*VaHY5*-GFP的农杆菌，通过花序浸染法转化拟南芥[19]，待其成熟收获种子记为T_0代。经卡那霉素筛选后得到T_1代植株，将播种后长出的幼苗使用CTAB法[20]提取DNA进行PCR检测，单株收取种子，重复上述操作，直至获得转基因纯合系（T_3代）。PCR检测具体步骤如下：使用20 μL的反应体系，7.0 μL ddH_2O、1.0 μL pCAMBIA2300-GFP-35S-F、1.0 μL pCAMBIA2300-GFP-R（附表1）、1.0 μL DNA和10.0 μL 2×Fast qPCR Master Mix。反应程序为94 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s，58 ℃ 30 s，72 ℃ 2 min，35个循环；72 ℃ 10 min；4 ℃保存。取经PCR检测的不同株系叶片进行活体成像分析（植物活体成像

系统PlantView100，广州博鹭腾）。

1.2.2　基因相对表达量分析　取4周龄野生型（wild type, WT）和T_3代转基因拟南芥叶片，加入液氮研磨，使用Omega Bio-Tek公司（E.Z.N.A. Plant RNA Kit I）RNA提取试剂盒进行RNA的提取，随后使用艾科瑞Evo M-MLV反转录试剂盒反转录合成cDNA。使用艾科瑞SYBR®Green Premix Pro-Taq HS qPCR试剂盒检测*VaHY5*不同株系的相对表达水平。基因特异性引物由上海生工公司（上海，中国）设计和合成（附表1）。所有RT-qPCR的反应体系均为20 μL，该体系包括上下游引物各1 μL、2 μL cDNA、10 μL 2× SYBR® Green Pro Taq HS Premix和6 μL无酶ddH_2O。反应条件为：95 ℃ 30 s；95 ℃ 15 s，60 ℃ 30 s，40个循环。每个样品包括3个生物学重复，每个生物学重复有3个技术重复。*AtActin1*作为内参基因，*VaHY5*基因的相对表达水平通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算。

1.2.3　转基因拟南芥的抗寒性鉴定　选择4周龄的WT和T_3代转基因株系。将WT和转基因拟南芥植株在4 ℃驯化3 d后，-6 ℃低温处理6 h，常温恢复培养3 d，观察并拍照记录-6 ℃低温处理前后WT和转基因拟南芥植株的形态变化，同时取样测定叶绿素荧光（叶绿素荧光活体成像系统PlantView230F，广州博鹭腾）和理化指标并完成组织染色，每个处理设3次生物学重复。

相对电导率的测定[21]。取大小均匀的植物叶片鲜样，自来水清洗后用蒸馏水冲洗3次，用滤纸吸干表面水分，用剪刀将叶片剪成均匀小块，快速称取3份，每份0.1 g，分别置于10 mL试管中，注入7 mL蒸馏水。盖上塞子置于室温下处理4 h，其间摇晃5次，使用电导率仪（DDS-11A型，上海雷磁）测电导率S_1。沸水浴20 min，待其冷却至室温后，摇匀，测电导率S_2（S_0为蒸馏水电导率）。

相对电导率（%）=（S_1–S_0）/（S_2–S_0）×100%。

过氧化氢酶（catalase, CAT）活性、过氧化物酶（peroxidase, POD）活性、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）活性、可溶性糖含量、丙二醛（malondialdehyde, MDA）含量、H_2O_2含量、$O_2^{\cdot-}$含量的测定参照南京建成生物工程研究所检测试剂盒（附表2）说明书完成。

DAB（3,3′-二氨基联苯胺）组织化学染色[22]步骤如下：配制1 mg/mL的DAB溶液，取低温处理前后的WT及转基因拟南芥叶片洗净，将其完全浸入溶液中，避光静置直至叶片有褐色沉积物，倒掉DAB染色液，之后经无水乙醇多次脱色处理，直至叶绿素完全褪去，拍照记录试验结果。NBT（氯化硝基四氮唑蓝）染色步骤同上。

1.2.4　冷胁迫相关基因的表达分析　为了分析抗寒相关基因的表达水平，幼苗在4 ℃驯化3 d后转入-6 ℃低温处理，在处理0、3、6 h采集WT和转基因株系的叶片，完成CBF-COR通路*AtCBF2*、*AtCBF3*、*AtCOR15a*和*AtCOR47* 4个基因的表达量分析，具体参照1.2.2，相关引物见附表1。

1.2.5　数据处理　数据整理用Excel 2016，采用IBM SPSS Statistics 27进行单因素方差分析。使用Origin 2021软件绘制图表，不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

2　结果

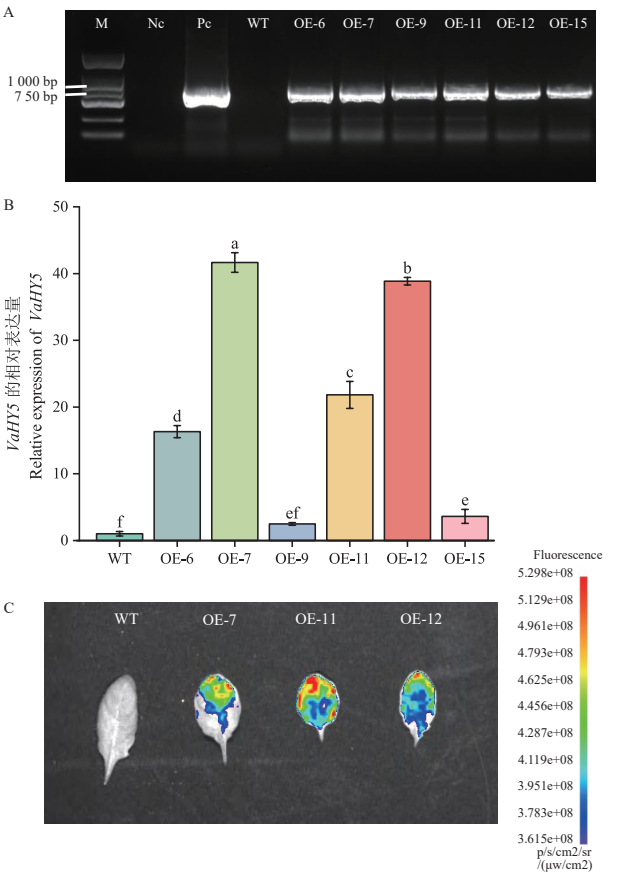
2.1　转基因株系的鉴定

将获得的6个T_3代过表达株系OE-6、OE-7、OE-9、OE-11、OE-12、OE-15进行PCR检测，发现均可检测到与阳性对照一致的条带（507 bp+ 276 bp）（图1-A）。进一步RT-qPCR结果表明，6个过表达株系相对表达量均高于WT，表明目的基因已成功转化至拟南芥中，OE-7、OE-11、OE-12 3个株系其表达量分别为WT的41.66倍、21.82倍和38.86倍（图1-B）。活体成像结果显示WT没有荧光，而OE-7、OE-11、OE-12具有明显的荧光（图1-C），因此选取这3个株系进行后续试验。

2.2　过表达植株及野生型在低温下的表型分析及叶绿素荧光测定

为了研究在拟南芥中过表达*VaHY5*的作用，首先观察WT和过表达株系在-6 ℃处理前后的表型变化，结果表明（图2-A），-6 ℃处理前WT和转基因株系的表型没有明显差异。然而，-6 ℃处理后，WT比过表达株系的叶片萎蔫更严重，经过3 d的常温恢复培养后，WT部分叶片死亡，而转基因拟南芥恢复了绿色。

在-6 ℃处理前，WT和过表达*VaHY5*拟南芥3个株系的叶绿素荧光没有显著差异，均有强烈荧光信号。但-6 ℃处理后，WT荧光几乎全部淬灭，而3个



A：PCR检测；B：拟南芥WT和转基因不同株系RT-qPCR检测；C：活体成像；M：DNA marker DL2000；Nc：阴性对照；Pc：阳性对照；WT：野生型拟南芥；OE-6–OE-15：转基因拟南芥不同株系；图中误差线表示标准误，不同小写字母表示显著性差异（$P<0.05$），下同

A: PCR detection. B: RT-qPCR detection of WT and transgenic *Arabidopsis* lines. C: Live imaging. M: DNA marker DL2000. Nc: Negative control. Pc: Positive control. WT: Wild-type *Arabidopsis*. OE-6–OE-15: different lines of transgenic *Arabidopsis*. Error bars represent standard error. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$). The same below

图1 过表达*VaHY5*拟南芥的鉴定及*VaHY5*表达量检测

Fig. 1 Identification of *Arabidopsis* overexpressing *VaHY5* and detection of *VaHY5* relative expression

过表达株系叶片还能观察到部分荧光（图2-B）。*Fv*/*Fm*值的变化也证实了这一结果，即WT和过表达*VaHY5*株系在-6 ℃处理前没有显著差异，而-6 ℃处理显著降低了光系统II（PSII）的最大光化学效率，但*VaHY5*过表达植株的*Fv*/*Fm*值仍显著高于WT植株（图2-C）。

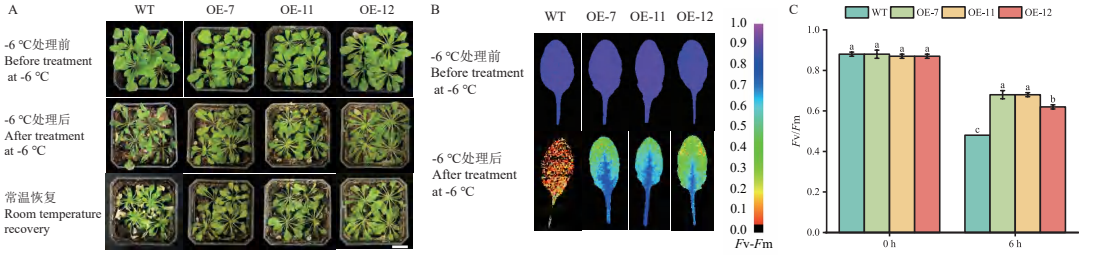
2.3 过表达植株及野生型在低温下的耐寒性分析

为探究*VaHY5*过表达对ROS积累的影响，通过DAB和NBT染色检测叶片中活性氧积累发现，在-6 ℃处理前，WT及过表达株系的叶片染色程度没有明显差异（图3-A、C），这表明在-6 ℃处理前WT及过表达株系叶片中ROS积累基本是一致的；但-6 ℃处理后，WT叶片DAB和NBT染色比过表达株系要深，且染色区域在叶片中分布更广泛，说明过表达株系中的活性氧ROS积累比WT植株要低（图3-A、C）。在-6 ℃处理前，WT及过表达株系的H_2O_2和$O_2^{\cdot-}$的含量无明显差异（图3-B、D），而-6 ℃处理后，WT植株的H_2O_2和$O_2^{\cdot-}$含量均显著高于过表达株系（图3-B、D），这与DAB、NBT染色结果一致，充分证实了*VaHY5*过表达能够增强植株在低温胁迫下的ROS清除能力，减少活性氧的积累。

为深入探究*VaHY5*基因在拟南芥抗寒响应中的调控功能，本研究系统测定了与植物抗寒密切相关的生理指标，包括抗氧化酶POD、SOD、CAT活性（图4-A–C），可溶性糖（图4-D）及膜损伤相关指标MDA、相对电导率（relative electrolytic leakage, REL）（图4-E、F）等。在-6 ℃处理前，WT与*VaHY5*过表达株系在上述所有测定指标中均未表现出显著差异。但在-6 ℃处理后过表达株系中的POD、SOD、CAT 3种抗氧化酶活性均显著高于WT，可溶性糖含量也高于WT；MDA含量和REL均显著低于WT，表明过表达株系中的膜透性物质含量要低于WT植株。

2.4 冷胁迫相关基因的表达量

为深入解析*VaHY5*调控拟南芥耐寒性的分子机制，选取拟南芥CBF-COR通路基因*AtCBF2*、*AtCBF3*、*AtCOR15a*和*AtCOR47*分析其在低温胁迫下的相对表达水平变化。结果表明，-6 ℃低温胁迫后上述抗寒相关基因均表现出不同程度的上调。在*VaHY5*过表达株系中上述抗寒基因的转录水平均显著高于野生型植株，且不同基因的响应特征存在差异：*AtCBF3*、*AtCOR15a*和*AtCOR47*（图5-B–D）在-6 ℃处理后3 h即呈现快速且强烈的表达上调，响应速度明显快于*AtCBF2*（图5-A），而野生型植株中各基因的表达峰值出现时间更晚、表达量更低。这一结果表明，*VaHY5*过表达能够显著增强低温胁迫下CBF-COR冷信号通路中抗寒关键基因的转录水平，从而增强拟南芥的冷防御机制，最终提高植株的耐寒能力。



A：WT和转基因株系在低温胁迫下的表型(比例尺为1 cm)；B：叶绿素荧光成像；C：*Fv*/*Fm*值

A: Phenotypes of WT and transgenic lines under low-temperature stress (scale is 1 cm). B: Chlorophyll fluorescence imaging. C: *Fv*/*Fm* value

图2　过表达*VaHY5*拟南芥的表型及叶绿素荧光测定

Fig. 2　Phenotype of *VaHY5* overexpressing *Arabidopsis* and chlorophyll fluorescence measurements

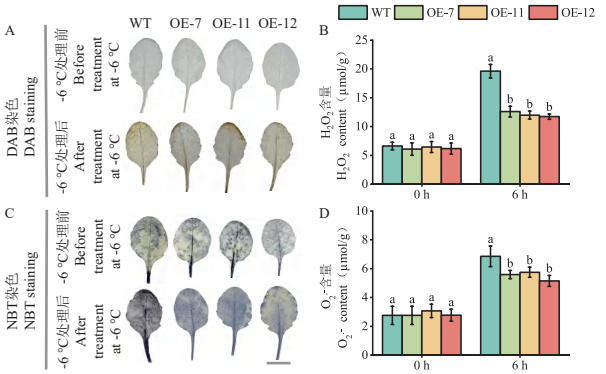


图3　组织化学染色及H_2O_2和$O_2^{\cdot-}$含量测定

Fig. 3　Histochemical staining and determination of H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$ content

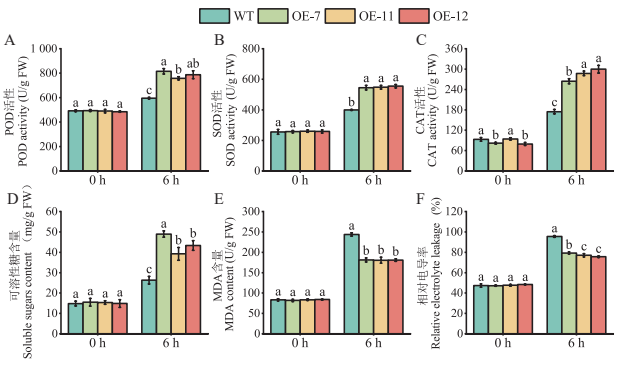


图4　低温胁迫下野生型和转基因拟南芥生理指标测定

Fig. 4　Measurement of physiological indicators in wild-type and transgenic *Arabidopsis* under cold stress

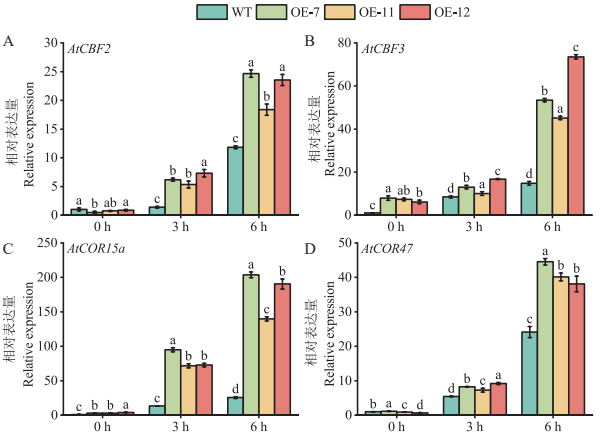


图5　低温胁迫下野生型和转基因拟南芥冷胁迫相关基因的表达量分析

Fig. 5　Expression analysis of cold stress-related genes in wild-type and transgenic *Arabidopsis* under low-temperature stress

3　讨论

HY5作为bZIP类转录因子，不仅是植物光形态建成的关键调控因子，近年来也被证实广泛参与包括低温在内的多种非生物胁迫。本研究通过将葡萄*VaHY5*基因在拟南芥中过表达，研究了该基因在拟南芥低温抗性中的功能，并对其潜在机制进行了初步探讨。

低温胁迫对植物的危害主要体现在细胞膜损伤、光合系统抑制和氧化胁迫等方面[23]。本研究发现，在低温处理后，野生型植株叶片严重萎蔫且恢复较慢，而*VaHY5*过表达株系叶片表现出轻微卷曲及较强的恢复能力，说明*VaHY5*能增强细胞在低温下的稳定性。低温可能会导致光合效率降低[24]，同样，本研究叶绿素荧光成像也显示低温胁迫下*VaHY5*过表达株系和WT叶片的*Fv*/*Fm*值较低温处理前有一定程度降低，但过表达株系的*Fv*/*Fm*下降幅度较小且

显著高于WT，表明*VaHY5*过表达可以增强拟南芥PSII光系统在环境胁迫下的稳定性，从而提高拟南芥的低温耐受性。多项生理指标的测定结果与表型相符，表现为过表达植株中REL和MDA含量显著低于WT，证明过表达植株其细胞膜受损程度较轻，膜透性维持较好。这一发现与前人的研究一致，即植物通过调节抗氧化防御可有效缓解低温引起的膜损伤[25]。这些研究结果初步表明过表达*VaHY5*可以增强拟南芥的抗寒能力。

冷应激诱导大量ROS产生，如H_2O_2和$O_2\cdot^-$，而ROS水平升高可导致氧化损伤[26]，植物可以通过增强抗氧化酶SOD、POD和CAT活性来去除多余的ROS[27]，但是否直接调控抗氧化酶基因的表达，还需更深入的研究来确定。在应对氧化胁迫方面，*VaHY5*过表达植株表现出更高效的活性氧清除能力。低温胁迫下，过表达株系中SOD、POD和CAT等抗氧化酶活性显著高于野生型，同时H_2O_2和$O_2\cdot^-$含量比WT显著降低，表明*VaHY5*可增强ROS清除能力，这与前人的研究结论一致[28-30]。这些结果进一步表明过表达*VaHY5*促进拟南芥的抗寒性。

CBF转录因子作为冷信号传递途径中的中心枢纽，在植物响应冷胁迫过程中起着重要作用。有研究表明，拟南芥受到低温胁迫时，*CBF1*、*CBF2*和*CBF3*能够快速地被诱导表达[31]。本研究通过分析*AtCBF2*和*AtCBF3*的表达水平发现，低温显著诱导了过表达拟南芥中*AtCBF2*和*AtCBF3*的表达。CBF转录因子作为低温应答的核心调节因子，可启动一系列下游冷响应基因（*CORs*）的表达，从而增强植物的抗寒性[32]。HY5调控拟南芥约1/3的基因，包括*CORs*基因[7]，该研究表明，与WT相比，转基因拟南芥中的*AtCOR15a*和*AtCOR47*基因在低温胁迫下表达量均显著升高。本研究结果与番茄中发现的*HY5-MYB15-CBF*调控模块相呼应[15]，表明*VaHY5*基因在拟南芥中可能通过激活CBF-COR冷响应通路增强拟南芥抗寒性。

综上所述，本研究通过异源过表达*VaHY5*，证实葡萄*VaHY5*基因能够显著提升拟南芥的低温耐受性。该研究不仅为阐明HY5转录因子在葡萄低温应答中的分子机制提供理论依据，同时表明葡萄*VaHY5*基因可作为极具应用价值的抗寒候选基因资源，为基因工程改良栽培葡萄抗寒性、培育抗寒新品种奠定理论基础。后续将进一步在葡萄中开展稳定遗传转化，验证*VaHY5*的抗寒功能；并筛选和验证与VaHY5蛋白互作的DNA和蛋白，解析其上下游信号通路或代谢调控网络，为葡萄抗寒分子育种提供更直接的理论与技术支撑。

4 结论

在低温胁迫下，*VaHY5*过表达植株通过提高活性氧的清除能力、增强抗氧化酶的活性及提升相关抗寒基因表达来增强转基因拟南芥抗寒性，为葡萄抗寒育种提供基因资源。

文章所有附表数据请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260424135752_NewsFile_39.pdf）。

参考文献

[1] 薛婷婷, 张佳佳, 聂榕博, 等. 中国酿酒葡萄越冬特性与保护措施研究进展 [J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(5): 83-95.
Xue TT, Zhang JJ, Nie RB, et al. Research progress on winter survival characteristics and protection measures of wine grapes in China [J]. J China Agric Univ, 2025, 30(5): 83-95.

[2] Kidokoro S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Transcriptional regulatory network of plant cold-stress responses [J]. Trends Plant Sci, 2022, 27(9): 922-935.

[3] Xi ZM, Wang ZZ, Fang YL, et al. Effects of 24-epibrassinolide on antioxidation defense and osmoregulation systems of young grapevines (*V. vinifera* L.) under chilling stress [J]. Plant Growth Regul, 2013, 71(1): 57-65.

[4] Ma JH, Yan XX, Qi XC, et al. The transcription factor VaWRKY72 from *Vitis amurensis* positively regulates cold tolerance in *Arabidopsis thaliana* and grapevine [J]. Plant Mol Biol, 2025, 115(5): 109.

[5] Meng L, Zhou HM, Tan LS, et al. VaWRKY65 contributes to cold tolerance through dual regulation of soluble sugar accumulation and reactive oxygen species scavenging in *Vitis amurensis* [J]. Hortic Res, 2025, 12(4): uhae367.

[6] Yu QH, Zheng QL, Liu C, et al. Phosphorylation-dependent VaMYB4a regulates cold stress in grapevine by inhibiting VaPIF3 and activating VaCBF4 [J]. Plant Physiol, 2025, 197(2): kiaf035.

[7] Ritonga FN, Chen S. Physiological and molecular mechanism involved in cold stress tolerance in plants [J]. Plants, 2020, 9(5): 560.

[8] Thomashow MF. PLANT COLD ACCLIMATION freezing tolerance

genes and regulatory mechanisms [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1999, 50: 571-599.

[9] Rubio S, Noriega X, Pérez FJ. Abscisic acid (ABA) and low temperatures synergistically increase the expression of CBF/DREB1 transcription factors and cold-hardiness in grapevine dormant buds [J]. Ann Bot, 2019, 123(4): 681-689.

[10] 窦雪婷, 朱熙, 张宁, 等. 马铃薯低温胁迫相关基因*StHY5*的功能分析 [J]. 园艺学报, 2025, 52(7): 1745-1757.
Dou XT, Zhu X, Zhang N, et al. Functional analysis of *StHY5* associated with low-temperature stress in potato [J]. Acta Hortic Sin, 2025, 52(7): 1745-1757.

[11] Jing YJ, Zhang D, Wang X, et al. *Arabidopsis* chromatin remodeling factor PICKLE interacts with transcription factor HY5 to regulate hypocotyl cell elongation [J]. Plant Cell, 2013, 25(1): 242-256.

[12] Cluis CP, Mouchel CF, Hardtke CS. The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways [J]. Plant J, 2004, 38(2): 332-347.

[13] Lee J, He K, Stolc V, et al. Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development [J]. Plant Cell, 2007, 19(3): 731-749.

[14] Wang F, Zhang LY, Chen XX, et al. SlHY5 integrates temperature, light, and hormone signaling to balance plant growth and cold tolerance [J]. Plant Physiol, 2019, 179(2): 749-760.

[15] Zhang LY, Jiang XC, Liu QY, et al. The HY5 and MYB15 transcription factors positively regulate cold tolerance in tomato via the CBF pathway [J]. Plant Cell Environ, 2020, 43(11): 2712-2726.

[16] Lin R, Zhang WJ, Tian R, et al. CPK27 enhances cold tolerance by promoting flavonoid biosynthesis through phosphorylating HY5 in tomato [J]. New Phytol, 2025, 246(5): 2174-2191.

[17] Liang L, Sui XY, Xiao JC, et al. ERD14 regulation by the HY5- or HY5-MED2 module mediates the cold signal transduction of *Asparagus* bean [J]. Plant J, 2025, 121: e17172.

[18] Liu GC, Zhang Z, Tian Y, et al. VvbZIP22 regulates quercetin synthesis to enhances cold resistance in grape [J]. Plant Sci, 2025, 350: 112293.

[19] Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 1998, 16(6): 735-743.

[20] 李金璐, 王硕, 于婧, 等. 一种改良的植物DNA提取方法 [J]. 植物学报, 2013, 48(1): 72-78.
Li JL, Wang S, Yu J, et al. A modified CTAB protocol for plant DNA extraction [J]. Chin Bull Bot, 2013, 48(1): 72-78.

[21] Patwari P, Salewski V, Gutbrod K, et al. Surface wax esters contribute to drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2019, 98(4): 727-744.

[22] 郑一羽, 王仕玉, 罗富寻, 等. 茄梨*HY5*基因的克隆及生物信息学分析 [J]. 中国南方果树, 2025, 54(1): 117-121.
Zheng YY, Wang SY, Luo FX, et al. Cloning and bioinformatics analysis of *HY5* gene of Clapp's favorite [J]. South China Fruits, 2025, 54(1): 117-121.

[23] 张瑶瑶, 吕晓元, 赵方贵, 等. 葡萄*VvZF-HD11*基因克隆及表达特性分析 [J]. 农业生物技术学报, 2025, 33(3): 547-560.
Zhang YY, Lyu XY, Zhao FG, et al. Cloning and expression characteristics analysis of *VvZF-HD11* gene in grape (*Vitis vinifera*) [J]. J Agric Biotechnol, 2025, 33(3): 547-560.

[24] Shi YT, Ding YL, Yang SH. Cold signal transduction and its interplay with phytohormones during cold acclimation [J]. Plant Cell Physiol, 2015, 56(1): 7-15.

[25] Qian ZF, He LL, Li FS. Understanding cold stress response mechanisms in plants: an overview [J]. Front Plant Sci, 2024, 15: 1443317.

[26] Li SH, Liu S, Zhang Q, et al. The interaction of ABA and ROS in plant growth and stress resistances [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 1050132.

[27] Gangappa SN, Botto JF. The multifaceted roles of HY5 in plant growth and development [J]. Mol Plant, 2016, 9(10): 1353-1365.

[28] Zhang Y, Liu X, Shi YJ, et al. The B-box transcription factor BnBBX22.A07 enhances salt stress tolerance by indirectly activating *BnWRKY33.C03* [J]. Plant Cell Environ, 2024, 47(12): 5424-5442.

[29] Ali Z, Sun YZ, Ma ZD, et al. VvHY5 and VvBEE1 antagonistically control resveratrol biosynthesis to mitigate high light-induced damage in grapevine [J]. J Integr Plant Biol, 2025, 67(4): 993-1008.

[30] Liu JY, Shi YT, Yang SH. Insights into the regulation of C-repeat binding factors in plant cold signaling [J]. J Integr Plant Biol, 2018, 60(9): 780-795.

[31] Gilmour SJ, Fowler SG, Thomashow MF. *Arabidopsis* transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities [J]. Plant Mol Biol, 2004, 54(5): 767-781.

[32] Zhang YJ, Yang JS, Guo SJ, et al. Over-expression of the *Arabidopsis CBF1* gene improves resistance of tomato leaves to low temperature under low irradiance [J]. Plant Biol, 2011, 13(2): 362-367.

（责任编辑　高洁）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):160-168

草莓*FaJAZ5*基因的克隆及其对盐胁迫的响应

黄姗 陈言 李桐 林邦语 梁玉梦 苟倩 林源秀 汤浩茹 张云婷*
（四川农业大学园艺学院，成都 611130）

摘 要：【目的】鉴定‘红颜’草莓（*Fragaria* × *ananassa* Duch.‘Benihoppe’）TIFY超家族成员*FaJAZ5*基因及其表达特性，揭示该基因在植物盐胁迫响应过程中的功能，为培育耐盐草莓新品种提供理论依据与基因资源。【方法】采用同源克隆法获得*FaJAZ5*基因序列，通过生物信息学分析其序列特征；利用RT-qPCR技术检测该基因在草莓不同组织中和盐胁迫下的表达模式；通过农杆菌介导的遗传转化法在烟草中异源表达*FaJAZ5*；对盐胁迫下的转基因烟草进行表型观测与相关生理指标测定。【结果】序列分析显示，*FaJAZ5*基因编码区全长543 bp，编码180个氨基酸，具有TIFY家族标志性基序；RT-qPCR分析表明，*FaJAZ5*基因表达具有组织特异性，在茎中表达量最高，盐胁迫能显著诱导*FaJAZ5*在根和叶中的表达；正常生长条件下，*FaJAZ5*过表达烟草的冠幅和叶绿素含量显著高于野生型，而株高和叶型与野生型无显著性差异。盐胁迫处理后，*FaJAZ5*过表达烟草出现迅速萎蔫现象，其丙二醛（MDA）和活性氧（ROS）含量显著高于野生型，同时渗透调节物质含量及抗氧化酶活性也显著高于野生型。【结论】盐胁迫下，*FaJAZ5*过表达烟草渗透调节物质含量和抗氧化酶活性提高，但盐胁迫造成的损伤程度已超过其抵御能力阈值，整体表现为对盐敏感性增加，表明*FaJAZ5*基因对植株的盐胁迫响应具有负调控作用。

关键词：草莓；*FaJAZ5*；序列特征；表达模式；异源表达；盐胁迫；生理响应
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1288

Cloning of Strawberry *FaJAZ5* Gene and Its Response to Salt Stress

HUANG Shan CHEN Yan LI Tong LIN Bang-yu LIANG Yu-meng GOU Qian LIN Yuan-xiu TANG Hao-ru ZHANG Yun-ting*
（*College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu* 611130）

Abstract:【Objective】To identify the TIFY superfamily member *FaJAZ5* gene and its expression characteristics in strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.‘Benihoppe’), and to elucidate its role in salt stress response, providing a theoretical basis and genetic resources for breeding salt-tolerant strawberry varieties.【Method】The *FaJAZ5* gene sequence was obtained via homologous cloning, and its sequence characteristics were analyzed using bioinformatics. The expression patterns of this gene in different strawberry tissues and under salt stress were detected by RT-qPCR. *FaJAZ5* was heterologously expressed in tobacco via an *Agrobacterium*-mediated genetic transformation method. Phenotypic observation and determination of related physiological indices were performed on the transgenic tobacco plants under salt stress.【Result】Sequence analysis revealed that the *FaJAZ5* gene had a complete coding region of 543 bp, encoding 180 amino acids and harboring the signature motif of the TIFY family. RT-qPCR analysis showed that the expression of *FaJAZ5* was tissue-specific, with the highest level detected in stems. Salt stress significantly induced the expression of *FaJAZ5* in roots and leaves. Under normal growth conditions, the plant canopy width and chlorophyll content of *FaJAZ5*-overexpressing tobacco plants were significantly higher than those of the wild type. However, no significant differences were observed in plant height and leaf morphology between the overexpressing lines and the wild type. After salt stress treatment, the overexpressing tobacco plants showed a rapid wilting phenotype. The levels of malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) in these plants were significantly higher than in the wild type. The contents of osmotic adjustment substances and the

收稿日期：2025-11-26
基金项目：国家自然科学基金项目（32302479），四川省自然科学基金项目（2023NSFSC1243），四川农业大学科研发展基金（0352312129094）
*通信作者：张云婷 asyunting@sicau.edu.cn

activities of antioxidant enzymes were also significantly elevated in the overexpressing lines compared with the wild type.【Conclusion】Although *FaJAZ5* overexpression in tobacco enhanced its stress resistance by increasing the contents of osmotic adjustment substances and the activities of antioxidant enzymes under salt stress, the extent of damage caused exceeded its defensive capacity. Overall, this resulted in an increased sensitivity to salt stress, indicating that the *FaJAZ5* gene plays a negative regulatory role in the plant response to salt stress.

Keywords: strawberry; *FaJAZ5*; sequence characteristics; expression pattern; heterologous expression; salt stress; physiological response

盐胁迫会导致植物缺水、离子失衡以及打破植物体内氧化平衡，从而对植物造成伤害[1]。植物在盐胁迫条件下会产生大量相容性有机溶质，如可溶性糖、可溶性蛋白以及脯氨酸等。通过提高胞内渗透压来增强植物对盐胁迫环境的抵御能力[2-3]。盐胁迫会诱导植物体内活性氧（ROS）的大量积累，诱发氧化应激，破坏体内氧化还原的平衡。植物通过激活过氧化物酶（POD）、过氧化氢酶（CAT）、超氧化物歧化酶（SOD）等抗氧化酶系统，利用多种酶促机制直接或间接地清除过量的活性氧（ROS），从而缓解盐胁迫造成的氧化损伤[4-5]。植物对盐胁迫的反应和适应还需要多种植物激素的整合和协调，其中茉莉酸及其生物活性衍生物，统称茉莉酸类物质（JAs），在植物盐胁迫响应中具有重要作用[6-7]。

JAZ（jasmonate ZIM-domain）蛋白是TIFY转录因子超家族成员，含有ZIM、NT和Jas 3个保守结构域，是JA信号通路的关键负调节因子。在正常生长条件下，植物体内茉莉酸–异亮氨酸（JA-Ile）水平较低，JAZ蛋白与下游转录因子互作抑制其活性，从而阻遏JA响应基因的激活。当植物受到盐胁迫等逆境刺激时，JA-Ile快速合成并与COI1-JAZ复合物结合，触发JAZ蛋白的泛素化降解，释放下游转录因子，从而激活JA响应基因的表达，调控植物的逆境防御反应[8-9]。近年来，JAZ蛋白在园艺作物盐胁迫响应中的功能已经得到广泛验证。在桂花（*Osmanthus fragrans*）中，OfLJAZ2与OfLMYB21结合形成转录复合物，抑制OfLMYB21对*OfFLS*的激活，进而减少黄酮合成、削弱ROS清除能力，最终降低植株对盐胁迫的耐受性[10]。而在温郁金（*Curcuma wenyujin*）中，CwJAZ4/9通过与CwMYC2的相互作用负反馈调节茉莉酸信号，以此平衡代谢与胁迫响应，从而赋予植物耐盐性[11]。在苹果（*Malus domestica*）中，盐胁迫下JA信号触发JAZ5蛋白泛素化降解，释放的MdWRKY9转录因子直接结合*MdNHX1*和*MdSOS2*启动子，激活离子平衡基因表达，从而增强耐盐性[12]。以上研究表明，JAZ蛋白是植物盐胁迫响应的重要调控因子。

草莓（*Fragaria* × *ananassa* Duch.）是蔷薇科草莓属多年生草本植物，因其果实口感美味，营养丰富，被誉为“水果皇后”[13]。然而，作为我国设施栽培中重要的浆果类作物，草莓在周年生产模式下普遍面临土壤次生盐渍化问题，由此引发的盐胁迫已成为制约设施草莓优质高产的主要环境因子[14]。因此，深入探究草莓在盐胁迫中的生理和分子机制，对草莓抗逆栽培具有重要的理论和实践意义。课题组前期通过酵母双杂交筛库鉴定得到FaJAZ5蛋白，推测其可能与胁迫相关[15]。目前在草莓中，对JAZ蛋白的研究多集中在果实发育等方面[16]，而关于*JAZ*基因在盐胁迫响应中的作用，尤其是*FaJAZ5*基因的具体功能，尚未有明确报道。

本研究从‘红颜’草莓中克隆得到*FaJAZ5*基因，对其进行序列和表达特性分析，结合异源过表达试验，以明确其在草莓盐胁迫响应中的作用。研究结果可为解析草莓盐胁迫响应的分子机制提供新的视角，并为筛选、培育抗性草莓品种提供理论依据和基因资源。

1　材料与方法

1.1　材料

栽培草莓‘红颜’（*Fragaria* × *ananassa* Duch. ‘Benihoppe’）的根、茎、叶、花、果（小绿、大绿、白果、半红和全红）等不同组织均采自于成都市温江区悦心草莓园（103°52′ E，30°39′ N）；本氏烟草（*Nicotiana benthamiana*）种子及组培苗为本课题组保存。

‘红颜’草莓幼苗购自浙江建德草莓种植基地，定植于直径16 cm、高14 cm的圆柱形塑料盆中，栽培基质按体积比混合（营养土、田园土及蛭石=5∶2∶1）。定植1个月后，选择长势一致且无病虫害的植株进行盐胁迫处理，每盆每3 d浇灌50 mL 200 mmol/L

NaCl溶液，连续处理直至植株开花，分别采集根和叶用于后续*FaJAZ5*基因的盐响应分析。

1.2 方法

1.2.1 *FaJAZ5*的克隆及其过表达载体构建 依据改良的CTAB法[17]提取‘红颜’草莓各组织的总RNA，采用反转录试剂盒对所得RNA进行反转录合成cDNA，-20 ℃保存备用。利用软件Primer 5.0设计上下游特异引物*FaJAZ5*-Flag-F和*FaJAZ5*-Flag-R（附表1），送至生工生物工程有限公司进行合成。采用同源克隆法对目的片段进行PCR扩增。PCR反应体系：cDNA模板1 μL、上下游特异引物各1 μL（10 μmol/L）、高保真酶（I-5^{TM} 2×High-Fidelity Master Mix）20 μL、ddH_2O补足至40 μL。PCR反应程序：98 ℃预变性2 min；98 ℃变性10 s，60 ℃退火10 s，72 ℃延伸10 s，38个循环；72 ℃终延伸5 min。采用琼脂糖凝胶电泳技术对扩增后的PCR产物进行检测，将含有目标DNA片段的凝胶区域切下。随后，使用诺唯赞DNA纯化试剂盒对目的片段进行提取纯化，再将纯化产物与过表达载体pCAMBIA1301-35S连接，转化大肠杆菌感受态DH5α并涂板，挑白色单菌落于含Kan抗生素的LB培养基中37 ℃振荡培养12 h至浑浊，对菌落进行PCR鉴定后，将阳性克隆送至生工生物工程有限公司测序。

1.2.2 生物信息学分析 利用DNAMAN软件对*FaJAZ5*编码的氨基酸序列进行保守结构域分析，明确其所属蛋白家族特征；借助NCBI ORFfinder在线工具（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/）预测基因开放阅读框（ORF），确定完整的编码区；通过ExPASy-ProtParam工具（https://web.expasy.org/protparam/）计算蛋白质基本理化性质，包括分子量（molecular weight）与等电点（isoelectric point, pI）。在NCBI数据库中下载草莓及其他物种同源蛋白的氨基酸序列，利用Clustal Omega在线软件（https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/）进行多重序列比对，分析序列一致性与变异特征；基于比对结果，使用MEGA 7.0软件采用邻接法（neighbor-joining, NJ）构建系统进化树，设置自举检验（bootstrap）重复次数为1 000次，以评估进化关系的可靠性。

1.2.3 RT-qPCR分析 根据克隆得到的*FaJAZ5*序列设计荧光定量引物*FaJAZ5*-q-F和*FaJAZ5*-q-R；*FaActin*-q-F和*FaActin*-q-R为内参引物（附表1）。采用20 μL反应体系：福际2×SYBR Green qPCR Mix 10.0 μL，10 μmol/L的上游引物0.8 μL，10 μmol/L的下游引物0.8 μL，稀释5-10倍的植物cDNA模板2.0 μL，剩余体积用RNase-free ddH_2O补至20 μL，即加入无酶纯水6.4 μL。扩增条件：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性10 s，60 ℃退火延伸30 s（荧光采集），40个循环；最后进行熔解曲线分析（95 ℃ 15 s，60 ℃ 60 s，95 ℃ 15 s），验证扩增特异性。使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目标基因的相对表达水平。

1.2.4 *FaJAZ5*转基因烟草的获得与鉴定 将构建好的过表达载体质粒（1301-35S-*FaJAZ5*-3Flag）采用冻融法转入农杆菌GV3101感受态细胞中。选取20-30 d叶龄的烟草组培苗，切取顶部第3-4片幼嫩且形态平展的叶片，在25 ℃黑暗培养条件下进行2 d预培养。农杆菌侵染后，转移至共培养基中，25 ℃暗培养2 d。共培养后的外植体转移到含特美汀和潮霉素的培养基中进行筛选培养。当愈伤组织形成不定芽时，切取分化芽进行生根培养，以形成完整植株。在烟草植株发育至6片真叶时，取生长状态良好的植株，采用组织化学染色法对完全展开叶进行GUS活性检测。同时，使用CTAB法提取叶片DNA，利用特异性引物*FaJAZ5*-Flag-F和*FaJAZ5*-Flag-R进行PCR扩增。结合GUS活性检测及PCR结果选取转化成功的烟草培养获得T_1代植株用于后续试验。

1.2.5 转基因烟草表型观测及相关指标测定 对过表达以及野生型植株统一管理，并在胁迫处理前1 d对各株系的株高、冠幅、叶形指数和叶绿素指数等生长型指标进行观察和测定。

为探究*FaJAZ5*在草莓盐胁迫中的作用，选取长势一致且生长状况良好的转基因和野生型烟草植株（每组取6-10株）进行盐胁迫试验，每株浇25 mL 150 mmol/L的NaCl溶液，隔天浇1次。在胁迫第7天时，观察表型并拍照记录，利用液氮迅速冷冻收取样品后-80 ℃保存，用于后续生理指标的测定。

过氧化氢（H_2O_2）含量采用苏州科铭生物技术有限公司的H_2O_2测定试剂盒进行测定；采用硫代巴比妥酸比色法（TBA）进行丙二醛（MDA）的测定[18]；采用蒽酮比色法测定可溶性糖含量；采用考马斯亮蓝染色法测定可溶性蛋白含量；采用茚三

酮比色法测定脯氨酸含量[19]；采用NBT光还原法测定SOD酶活性；采用紫外吸收法测定CAT酶活性；愈创木酚法测定POD酶活性[20]。

1.2.6　数据统计与分析　使用Excel 2010对测定数据进行整理，在SPSS23.0软件中对数据进行单因素方差分析并采用Tukey检验的方式评估各组间的显著性差异（$P<0.05$），使用Origin 2025进行图表绘制。

2　结果

2.1　*FaJAZ5*基因的序列与时空表达分析

以‘红颜’草莓cDNA为模板进行PCR片段扩增，经过胶回收以及测序比对，得到*FaJAZ5*基因。DNAMAN和ORFfinder分析，*FaJAZ5*基因开放阅读框长543 bp，编码180个氨基酸。ExPASy-ProtParam tool预测FaJAZ5蛋白的理论等电点为9.59，分子量为19 607.47 Da，GRAVY值为-0.432，属于亲水性蛋白。将FaJAZ5进行同源蛋白多序列比对发现，不同植物之间的同源性较高，说明JAZ5具有较高的保守性（图1-A）。系统进化树分析发现，栽培草莓（*Fragaria* × *ananassa*）与野生草莓（*Fragaria vesca*）为100%高支持分支，亲缘关系最近（图1-B）。RT-qPCR分析显示，*FaJAZ5*基因在栽培草莓‘红颜’根、茎、花中的表达量较高，其中在茎中的表达量最高；在果实发育过程中，*FaJAZ5*基因在绿果期表达较高，转色后表达量显著降低（图1-C）。这表明该基因的表达在不同组织和果实不同发育时期存在特异性，这种差异性可能反映了其在不同组织和果实发育不同时期中的功能有所不同。

2.2　*FaJAZ5*基因在草莓盐胁迫下的表达模式分析

为探究*FaJAZ5*基因对盐胁迫的响应，检测盐胁迫处理下栽培草莓‘红颜’根和叶片中*FaJAZ5*基因的转录水平。在正常生长条件下（CK组），该基因在根中的表达显著高于叶片，这与上述组织特异性表达检测结果一致。经NaCl处理后，其在根和叶片中的转录水平均被显著诱导，相对表达量升高（图2）。该结果不仅证实*FaJAZ5*基因的组织特异性表达模式，更提示该基因可能在植物响应盐胁迫的过程中扮演重要角色。

2.3　过表达烟草的鉴定与表型分析

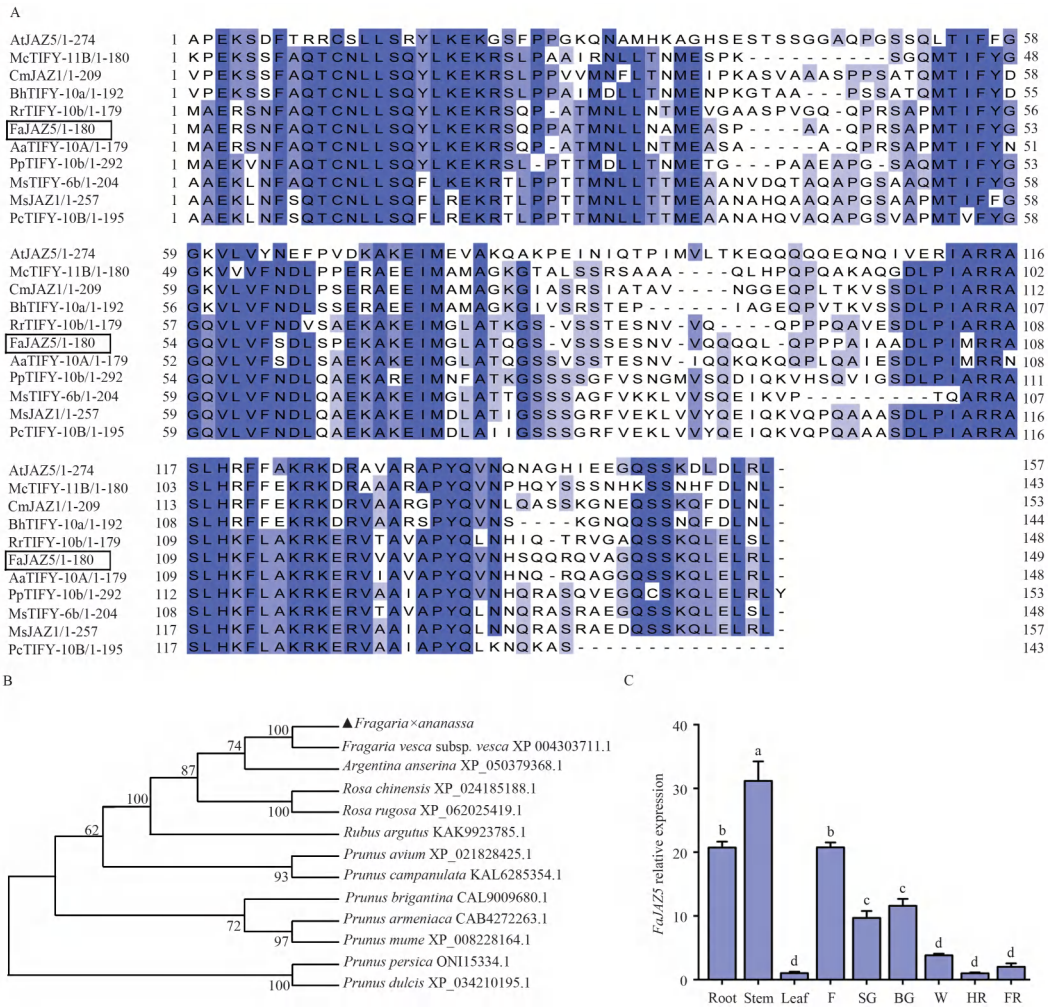
对过表达植株进行GUS染色，以野生型植株WT作为对照，OE-1、OE-22、OE-27过表达植株的叶片成功染色（图3-A）；提取植株DNA，经PCR扩增后进行凝胶电泳检测，结果显示扩增条带均在543 bp左右（图3-B），表明OE-1、OE-22、OE-27株系均为*FaJAZ5*过表达植株。

正常培养条件下，过表达株系OE-1、OE-22、OE-27与野生型植株进行比较，冠幅有显著提升，分别提高了20.46%、24.81%、39.10%（图4-D）；叶绿素含量较野生型烟草也有显著提升，分别提高了9.09%、24.71%、25.85%（图4-C）；而株高与叶形指数并没有呈现显著差异（图4-A、B）。由此可见，*FaJAZ5*在正常生长环境条件下可能对植株生长有促进作用。

2.4　*FaJAZ5*过表达烟草盐胁迫处理后相关生理指标分析

2.4.1　过表达*FaJAZ5*对植株表型和膜脂过氧化指标的影响　盐胁迫会对植物的生物膜系统造成一定程度破坏，影响植物体内的正常代谢，从而影响植物正常生长发育。盐胁迫处理后，相比于野生型植株，过表达株系呈现更严重的萎蔫状态（图5-A）。与野生型植株相比，过表达植株叶片中MDA含量显著升高，OE-1、OE-22、OE-27增幅分别达58.64%、51.51%、68.35%（图5-B）；茎中OE-1、OE-22 2个株系与野生型存在显著差异，分别增加了72.35%、56.92%（图5-C）。OE-1、OE-22 2个过表达株系叶片中H_2O_2含量与野生型存在显著差异，分别增加了69.34%、9.01%（图5-D）；茎中H_2O_2含量相显著高于野生型，OE-1、OE-22、OE-27分别增加98.23%、69.83%、11.4%（图5-E）。以上结果表明*FaJAZ5*很可能以负调控的方式响应盐胁迫，加重植株的膜脂过氧化程度，使植物更不耐盐。

2.4.2　过表达*FaJAZ5*对植株渗透调节物质含量的影响　渗透调节物质在植株受到胁迫时能够起到减缓和保护的作用，是衡量植株抵抗胁迫能力的重要指标。与野生型植株相比，*FaJAZ5*过表达植株叶片中可溶性糖含量呈升高趋势，其中OE-1、OE-22 2个株系显著升高，分别升高37.33%、95.76%（图6-A），而在茎中则呈下降趋势，OE-1显著下降29.9%（图6-B）。叶片中，过表达植株OE-27可溶性蛋白含量显著下降46.14%（图6-C），而在茎中，OE-1、OE-22、OE-27均显著升高，分别升高126.3%、226.7%、35.1%（图6-D）。与野生型相比，过表达



At：拟南芥；Mc：苦瓜；Cm：甜瓜；Bh：冬瓜；Rr：玫瑰；Fa：草莓；Aa：蒺藜；Pp：桃；Ms：欧洲野苹果；F：花；SG：小绿果；BG：大绿果；W：白果；HR：半红果；FR：全红果。柱状图上标的不同小写字母表示各实验处理间存在统计学显著差异（P<0.05）。下同

At: *Arabidopsis thaliana*; Mc: *Momordica charantia*; Cm: *Cucumis melo*; Bh: *Benincasa hispida*; Rr: *Rosa rugosa*; Fa: *Fragaria* × *ananassa*; Aa: *Argentina anserina*; Pp: *Prunus persica*; Ms: *Malus sylvestris*. F: Flower; SG: small green fruit; BG: big green fruit; W: white fruit; HR: half-red fruit; FR: full-red fruit. Bars with different lowercase letters indicate significant differences at P<0.05. The same below

图1 FaJAZ5蛋白序列多重比对（A）、系统发育树（B）和*FaJAZ5*基因在草莓不同组织和不同发育时期果实中的表达量（C）

Fig. 1 Multiple alignment of FaJAZ5 protein sequences (A), phylogenetic tree (B), and expression analysis of the *FaJAZ5* gene in different tissues of strawberry and fruits at different developmental stages (C)

植株叶片中脯氨酸含量均显著增加，OE-1、OE-22、OE-27分别升高155.7%、106.1%、25.59%（图6-E），而在茎中也呈现出同样显著上升的趋势，分别升高264.8%、238.3%、29.4%（图6-F）。以上结果表明，*FaJAZ5*在植株中参与渗透调节物质的调控，在不同组织间作用程度存在差异。

2.4.3 过表达*FaJAZ5*对植株抗氧化酶活性的影响 SOD、POD、CAT等抗氧化酶是植物应对胁迫时非常重要的工具，能够及时清除活性氧，保护植物细胞的膜结构以及维持细胞代谢的正常运转，是评判植物抵御胁迫能力的重要指标。盐胁迫处理后，与野生型相比，过表达株系OE-1、OE-22叶片中SOD活性显著提升，分别提高了15.70%、31.66%（图7-A）；在茎中，3个过表达株系的SOD活性均显著提升，OE-1、OE-22、OE-27分别提高了127.2%、209.3%、78.3%（图7-B）。过表达植株OE-1、OE-22叶片中

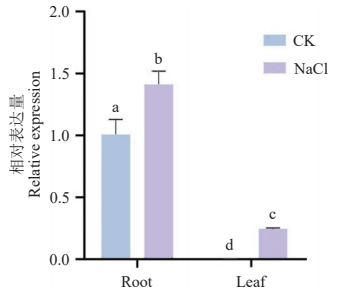
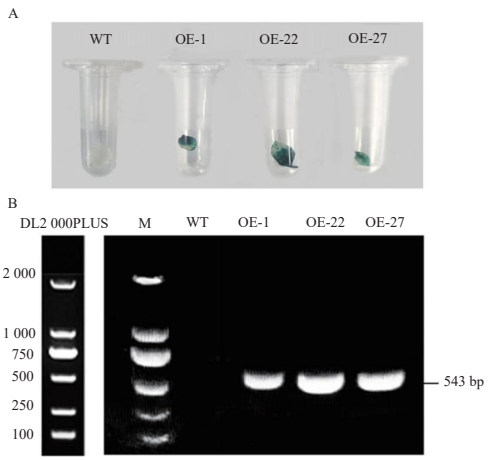


图2　*FaJAZ5*基因在草莓盐胁迫下的表达模式

Fig. 2　Expression pattern of the *FaJAZ5* gene in strawberry under salt stress



WT:野生型;OE-1、OE-22、OE-27:3个*FaJAZ5*过表达株系。下同

WT: Wild type; OE-1, OE-22, OE-27: three *FaJAZ5* overexpression lines. The same below

图3　*FaJAZ5*过表达烟草的GUS(A)和PCR(B)检测

Fig. 3　GUS (A) detection and PCR (B) of *FaJAZ5*-overexpressing tobacco

POD活性相比野生型显著提高，分别提高104.6%、47.22%（图7-C）；在茎中，3个过表达株系的POD活性均显著提升，OE-1、OE-22、OE-27分别提高了108.7%、109.4%、39.7%（图7-D）。过表达植株OE-1、OE-27叶片中CAT活性相比野生型显著提高，分别提高了14.70%、11.85%（图7-E）；在茎中，过表达植株OE-1、OE-22的CAT活性相比野生型分别显著提高了29.82%、38.72%（图7-F）。以上结果表明，JAZ5在植株受到盐胁迫时整体上能增强抗氧化酶活性，以减少胁迫造成的损伤，其对植株的抗氧化能力有促进作用。

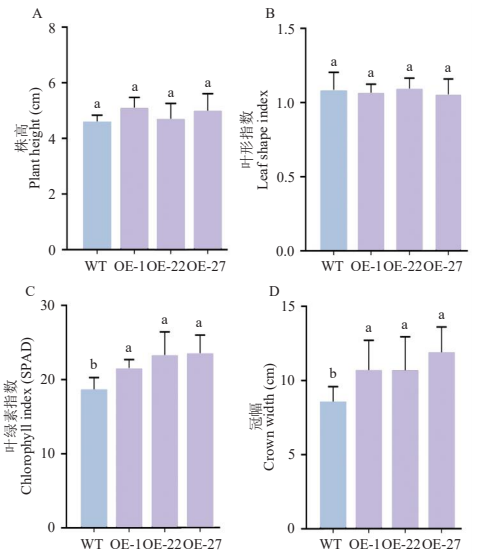


图4　正常生长条件下过表达*FaJAZ5*对植株形态指标的影响

Fig. 4　Effects of *FaJAZ5* overexpression on plant morphological indicators under normal growth conditions

3　讨论

JAZ蛋白是植物茉莉酸信号通路的核心负调控因子，属于TIFY蛋白家族，其参与植物的多种生物学过程，如花青素积累、开花时间、次生代谢物合成及其他发育过程，也是许多调控信号网络的重要组成部分。JAZ蛋白在植物生长发育中通过调控茉莉酸信号通路与其他激素信号的交叉互作，实现对植物器官发生、形态建成、生长发育及胁迫应答的精细调控[21]。

目前，已从多种园艺植物中鉴定出数量不等的JAZ蛋白，如番茄中有13个[22]，甘蓝中有22个[23]，茶树中有12个[24]。本研究从‘红颜’草莓中克隆得到1个*JAZ*基因，将其命名为*FaJAZ5*。荧光定量分析发现，*FaJAZ5*在所有组织中均有表达，表明其在草莓生长发育过程中可能发挥重要的作用。同时，*FaJAZ5*表达量随着草莓果实的发育呈现下降趋势。研究表明，JAZ蛋白广泛参与果实成熟相关的色素积累、软化、糖酸代谢等关键生物学过程[25]。*VvTIFY 5A*通过抑制花青素合成并参与BR-JA信号互作，在采后葡萄中发挥成熟抑制作用[26]。在苹果中，JAZ蛋白作为负调控因子，通过直接与转录因子ERF4互作，形成阻遏复合体抑制乙烯合成关键基

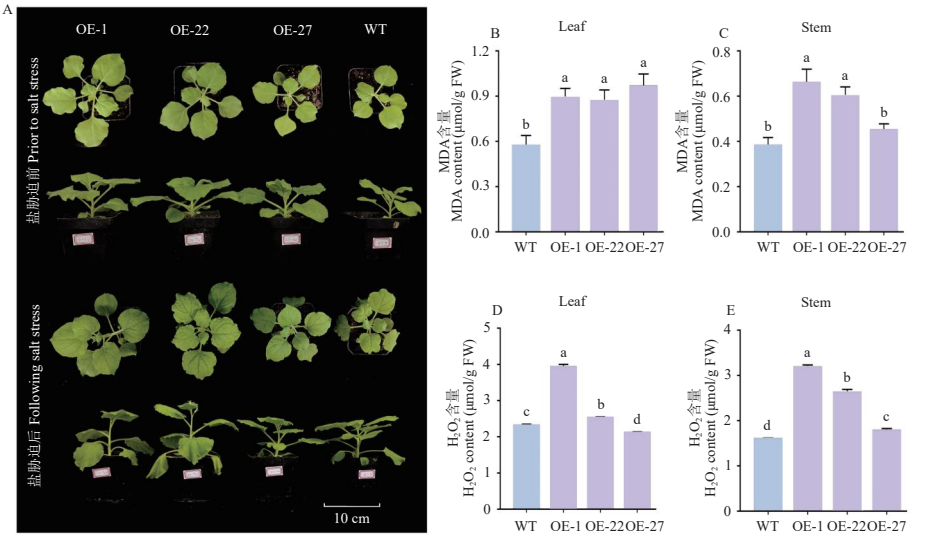


图5 过表达*FaJAZ5*对盐胁迫下植株表型(A)及膜脂过氧化指标(B–E)的影响

Fig. 5 Effects of *FaJAZ5* overexpression on plant phenotype (A) and membrane lipid peroxidation indices (B–E) under salt stress

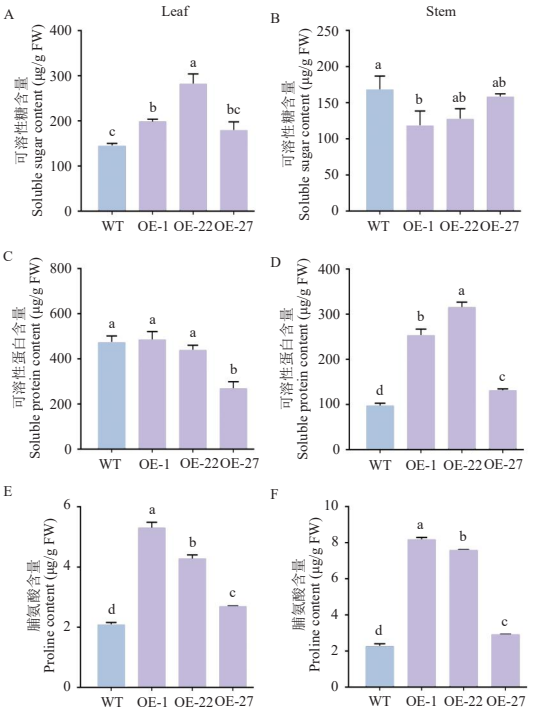


图6 过表达*FaJAZ5*对植株渗透调节物质的影响

Fig. 6 Effects of *FaJAZ5* overexpression on osmotic adjustment substances in plants

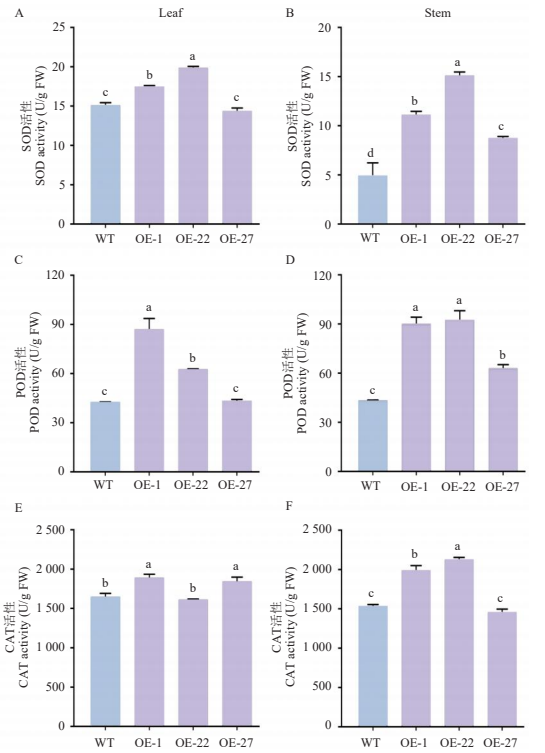


图7 过表达*FaJAZ5*对植株抗氧化酶活性的影响

Fig. 7 Effects of *FaJAZ5* overexpression on plant antioxidant enzyme activities

因*ACS1/ACO1*的表达，从而阻碍果实软化。而抑制JAZ表达可有效解除这一封锁，进而促进果实成熟[27]。基于此，我们推测*FaJAZ5*可能参与了草莓果实的成熟过程。

在本研究中，盐胁迫后*FaJAZ5*基因的表达在根

和叶中显著上调，表明其可能在草莓盐胁迫响应过程中发挥作用。研究表明，JAZ蛋白在盐胁迫中通过抑制NF-Y转录复合体发挥负调控作用；盐胁迫激活茉莉酸信号导致JAZ降解，进而释放NF-Y复合体的转录活性，最终启动下游耐盐基因表达。[28]。本研究将*FaJAZ5*基因异源过表达到本氏烟草中发现，植株在正常生长条件下表现出冠幅和叶绿素含量的显著提升，表明其可能通过调控JA信号与光合相关通路的协同作用，促进植物营养生长，这与部分*JAZ*成员在拟南芥中对生长的正向调控功能相似[29]。*AtJAZ3*与PIF4（光敏色素互作因子）结合参与光形态建成，调控叶片伸展相关基因，影响叶面积与形态[30]。在盐胁迫条件下，过表达株系表现出更严重的萎蔫状态，同时膜脂过氧化指标（MDA和H_2O_2）显著升高，表明*FaJAZ5*可能通过负调控方式参与盐胁迫响应，提升了植株对盐胁迫的敏感性。其调控作用与前人报道的拟南芥*AtJAZ8*[28]、紫花苜蓿（*Medicago sativa*）*MsTIFY10a*[31]等JAZ蛋白类似，均以负调控方式参与盐胁迫响应，增加植株对盐胁迫的敏感性。尽管*FaJAZ5*过表达株系盐胁迫下膜脂过氧化程度更高，但其脯氨酸含量及抗氧化酶（SOD、POD、CAT）活性显著提升，表明*FaJAZ5*可诱导植物渗透调节与抗氧化防御机制的激活。这种“损伤加剧但防御激活”的双重表现，与向日葵*JAZ*家族部分基因在胁迫下的调控特征相似[32]。以上结果提示，*FaJAZ5*在盐胁迫响应中可能存在复杂的调控模式，虽能启动基础防御反应，但因其JA信号负调控的主导作用，无法有效缓解盐胁迫造成的损伤，最终表现为耐盐性下降。后续需进一步鉴定与FaJAZ5互作的相关转录因子及下游盐响应基因，以进一步明确其分子调控机制。

4　结论

克隆获得‘红颜’草莓*FaJAZ5*基因，其表达具有组织特异性，盐胁迫可诱导其在根、叶中表达上调。过表达*FaJAZ5*烟草正常条件下生长更优，盐胁迫后则表现为敏感，启动防御应答但依旧无法抵消损伤，推测*FaJAZ5*负调控植株盐胁迫响应。

文章所有附表数据请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260626163934_NewsFile_98.pdf）

参考文献

[1] Zhang YT, Deng MY, Lin BY, et al. Physiological and transcriptomic evidence revealed the role of exogenous GABA in enhancing salt tolerance in strawberry seedlings [J]. BMC Genom, 2025, 26: 196.

[2] Niu TH, Zhang J, Li J, et al. Effects of exogenous Glycine betaine and cycloleucine on photosynthetic capacity, amino acid composition, and hormone metabolism in *Solanum melongena* L [J]. Sci Rep, 2023, 13: 7626.

[3] Zhong Y, Liu CZ, Wei B, et al. Exogenous 5-aminolevulinic acid promotes osmotic stress tolerance of walnuts by modulating photosynthesis, osmotic adjustment and antioxidant systems [J]. Forests, 2023, 14(9): 1789.

[4] Zheng C, Chen JP, Wang XW, et al. Reactive oxygen species in plants: metabolism, signaling, and oxidative modifications [J]. Antioxidants, 2025, 14(6): 617.

[5] Rajput VD, Harish, Singh RK, et al. Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress [J]. Biology, 2021, 10(4): 267.

[6] Chen HY, Liu XN, Li SC, et al. The class B heat shock factor HSFB1 regulates heat tolerance in grapevine [J]. Hortic Res, 2023, 10(3): uhad001.

[7] Gupta A, Bhardwaj M, Tran LP. JASMONATE ZIM-DOMAIN family proteins: important nodes in jasmonic acid-abscisic acid crosstalk for regulating plant response to drought [J]. Curr Protein Pept Sci, 2021, 22(11): 759-766.

[8] 曹晓蔓. 茉莉酸信号转录抑制关键组分JAZ与NINJA互作机制研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2021.
Cao XM. The interaction mechanism of transcription repressor JAZ and NINJA in jasmonate signaling [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2021.

[9] Sen S, DasGupta M. Involvement of *Arachis hypogaea* jasmonate ZIM domain/TIFY proteins in root nodule symbiosis [J]. J Plant Res, 2021, 134(2): 307-326.

[10] Li WL, Yu SM, Zhang KM, et al. Characterization of the JAZ family in *Osmanthus fragrans* and the role of OfLJAZ2 in flavonoid synthesis mediated regulation of salt and drought stress tolerance [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 228: 110235.

[11] Wang XY, Zhu NN, Yang JS, et al. CwJAZ4/9 negatively regulates jasmonate-mediated biosynthesis of terpenoids through interacting with CwMYC2 and confers salt tolerance in *Curcuma wenyujin* [J]. Plant Cell Environ, 2024, 47(8): 3090-3110.

[12] Zhao J, Zhang S, Yu Z, et al. The transcription factor MdWRKY9 is involved in jasmonic acid-mediated salt stress tolerance in apple [J]. Hortic Res, 2025, 12(6): uhaf068.

[13] Chen Q, Long Y, Yang M, et al. *FaPKc2.2* negatively modulates

strawberry fruit ripening by reprograming the carbon metabolic pathway [J]. Sci Hortic, 2022, 301: 111114.

[14] 孙崇皓, 张磊, 彭福田. 亚硒酸钠对盐胁迫环境下草莓生长发育的影响 [J]. 中国果树, 2023(10): 52-57, 141.
Sun CH, Zhang L, Peng FT. Effect of sodium selenite on the growth and development of strawberries under salt stress [J]. China Fruits, 2023(10): 52-57, 141.

[15] 叶宇芸. 隐花色素 *CRY1* 和 *CRY2* 在草莓生长发育中的功能鉴定 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2022.
Ye YY. Functional identification of cryptochromes *CRY1* and *CRY2* in strawberry growth and development [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2022.

[16] Wang W, Ouyang JY, Li YT, et al. A signaling cascade mediating fruit trait development via phosphorylation-modulated nuclear accumulation of JAZ repressor [J]. J Integr Plant Biol, 2024, 66(6): 1106-1125.

[17] 蒲文超. 草莓隐花色素基因 *FaCRY1* 的功能鉴定 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2022.
Pu WC. Functional identification of strawberry cryptochrome gene *FaCRY1* [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2022.

[18] 肖家昶, 雷凤芸, 肖龙仲, 等. 邻苯二甲酸对不同砧木西瓜嫁接苗根系生理特性及矿物质含量的影响 [J]. 西北农业学报, 2023, 32(3): 368-376.
Xiao JC, Lei FY, Xiao LZ, et al. Effect of phthalic acid on root physiological characteristics and mineral content of grafted watermelon seedlings with different rootstocks [J]. Acta Agric Boreali Occidentalis Sin, 2023, 32(3): 368-376.

[19] 雷娟利, 赵彦婷, 岳智臣, 等. 甘蓝品种间可溶性糖含量分析 [J]. 浙江农业科学, 2023, 64(2): 463-465.
Lei JL, Zhao YT, Yue ZC, et al. Analysis of soluble sugar content among cabbage varieties [J]. J Zhejiang Agric Sci, 2023, 64(2): 463-465.

[20] 杨正宇, 周佳君, 胡恒康, 等. 香榧胚性愈伤组织的悬浮培养动力学及对赤霉素的响应 [J]. 浙江农林大学学报, 2025, 42(1): 103-111.
Yang ZY, Zhou JJ, Hu HK, et al. Suspension culture dynamics of embryogenic callus from *Torreya grandis* 'Merrillii' and its response to gibberellin [J]. J Zhejiang A&F Univ, 2025, 42(1): 103-111.

[21] Zhao X, Jiang XM, Li ZY, et al. Jasmonic acid regulates lignin deposition in poplar through JAZ5-MYB/NAC interaction [J]. Front Plant Sci, 2023, 14: 1232880.

[22] 林晨俞, 郭鑫, 王文娟, 等. 番茄 *SlJAZ7* 的抗病功能及与 SlTGA7 的互作 [J]. 华南农业大学学报, 2024, 45(4): 525-534.
Lin CY, Guo X, Wang WJ, et al. Disease resistance of *SlJAZ7* and its interaction with SlTGA7 in tomato [J]. J South China Agric Univ, 2024, 45(4): 525-534.

[23] 张欣欣, 陶涛, 李杭春, 等. JAZ 在园艺植物生长发育中的调控作用 [J]. 生物工程学报, 2025, 41(2): 530-545.
Zhang XX, Tao T, Li HC, et al. Regulatory roles of JAZ in the growth and development of horticultural plants [J]. Chin J Biotechnol, 2025, 41(2): 530-545.

[24] Shen JZ, Zou ZW, Xing HQ, et al. Genome-wide analysis reveals stress and hormone responsive patterns of *JAZ* family genes in *Camellia sinensis* [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7): 2433.

[25] Wang W, Dai ZR, Wang P, et al. Jasmonate ZIM-domain proteins regulate fruit ripening and quality traits: mechanisms and advances [J]. Food Qual Saf, 2025, 9: fyaf022.

[26] Pei D, Ren YH, Yu WB, et al. The roles of brassinosteroids and methyl jasmonate on postharvest grape by regulating the interaction between VvDWF4 and VvTIFY 5A [J]. Plant Sci, 2023, 336: 111830.

[27] Hu YN, Sun HL, Han ZY, et al. ERF4 affects fruit ripening by acting as a JAZ interactor between ethylene and jasmonic acid hormone signaling pathways [J]. Hortic Plant J, 2022, 8(6): 689-699.

[28] Li X, Li CJ, Shi L, et al. Jasmonate signaling pathway confers salt tolerance through a NUCLEAR FACTOR-Y trimeric transcription factor complex in *Arabidopsis* [J]. Cell Rep, 2024, 43(3): 113825.

[29] Liu B, Seong K, Pang SH, et al. Functional specificity, diversity, and redundancy of *Arabidopsis* JAZ family repressors in jasmonate and COI1-regulated growth, development, and defense [J]. New Phytol, 2021, 231(4): 1525-1545.

[30] Huai JL, Gao N, Yao YY, et al. JASMONATE ZIM-domain protein 3 regulates photomorphogenesis and thermomorphogenesis through inhibiting PIF4 in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2024, 195(3): 2274-2288.

[31] Chen Q, Zhang Y, Tian Y, et al. *MsTIFY10a* gene from alfalfa negatively regulates drought and salt tolerance in transgenic tobacco [J]. J Plant Physiol, 2026, 317: 154684.

[32] Song HF, Fu XX, Li J, et al. Phylogenetic analysis and expression profiles of jasmonate ZIM-domain gene family provide insight into abiotic stress resistance in sunflower [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 1010404.

(责任编辑 高洁)

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):169-176

森林草莓*FveTCP5*基因在盐胁迫中的功能分析

董向向[1] 缪百灵[1] 陈娟娟[1] 张坤鹏[1] 李亮杰[1] 周厚成[2*] 朱庆松[1*]
（1.信阳农林学院园艺学院,信阳 464000; 2.中国农业科学院郑州果树研究所,郑州 450009）

摘 要： 【目的】TCP转录因子在植物抵御逆境胁迫过程中发挥重要作用，解析森林草莓*FveTCP5*基因在响应盐胁迫方面的功能，为培育草莓耐盐新品种提供基因资源。【方法】以森林草莓‘Ruegen’为材料，克隆*FveTCP5*基因，结合生物信息学方法分析其理化性质、结构特征和系统进化关系；利用RT-qPCR技术测定*FveTCP5*基因在森林草莓不同组织中的表达模式；构建*FveTCP5*基因的过表达载体，利用花序浸染法获得转基因拟南芥过表达株系；用150 mmol/L NaCl处理转基因拟南芥株系，测定相关生理指标和盐胁迫响应相关基因的表达水平，开展耐盐功能验证。【结果】*FveTCP5*基因CDS全长1 131 bp，编码376个氨基酸；系统进化分析表明，FveTCP5与蔷薇科其他物种的TCP5蛋白间亲缘关系较近；RT-qPCR结果显示，*FveTCP5*基因在森林草莓各组织中均普遍表达，在叶片中的表达量最高。在NaCl处理下，过表达*FveTCP5*拟南芥株系的子叶绿化率和根长均显著高于野生型；测定相关生理指标显示，转基因植株的丙二醛含量较野生型显著降低，而叶绿素、脯氨酸含量和超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化物酶（POD）和过氧化氢酶（CAT）活性较野生型均显著升高。此外，盐胁迫响应相关基因*AtSOS1*、*AtSOS2*、*AtNHX1*、*AtHKT1*、*AtCOR15A*和*AtRD29A*的表达水平较野生型均有所提高。【结论】过表达*FveTCP5*可通过促进盐胁迫响应相关基因的表达来提高拟南芥的耐盐性，推测*FveTCP5*在草莓盐胁迫响应中发挥重要功能。

关键词： 草莓；TCP5；盐胁迫；生物信息学分析；转基因拟南芥；基因表达；生理生化指标；功能分析
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0311

Functional Analysis of *FveTCP5* Gene in *Fragaria vesca* under Salt Stress

DONG Xiang-xiang[1] MIAO Bai-ling[1] CHEN Juan-juan[1] ZHANG Kun-peng[1] LI Liang-jie[1] ZHOU Hou-cheng[2*] ZHU Qing-song[1*]
（1. *College of Horticulture, Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang* 464000; 2. *Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou* 450009）

Abstract: 【Objective】TCP transcription factors play important roles in plant stress responses. This study aims to characterize the function of the *FveTCP5* gene in *Fragaria vesca* under salt stress, thereby providing genetic resources for breeding new salt-tolerant strawberry varieties. 【Method】Using woodland strawberry ‘Ruegen’ as the experimental material, we cloned *FveTCP5* and analyzed its physicochemical properties, structural characteristics, and phylogenetic relationships via bioinformatics approaches. The expression pattern of *FveTCP5* in different tissues of woodland strawberry was determined by RT-qPCR. An overexpression vector of *FveTCP5* was constructed, and transgenic *Arabidopsis* lines were obtained through floral dip transformation. These transgenic lines were treated with 150 mmol/L NaCl, and relevant physiological indices as well as the expression levels of salt stress-responsive genes were measured to validate salt tolerance function. 【Result】The full-length CDS of *FveTCP5* is 1 131 bp, encoding 376 amino acids. Phylogenetic analysis showed that FveTCP5 is closely related to TCP5 proteins from other Rosaceae species. RT-qPCR revealed that *FveTCP5* was ubiquitously expressed in various tissues of woodland strawberry, with the highest transcript level in leaves. Under NaCl treatment, *Arabidopsis* lines overexpressing *FveTCP5* exhibited

收稿日期：2026-03-18
基金项目：河南省科技攻关项目（252102111155），河南省高等学校重点科研计划项目（24B210011），农业农村部园艺作物（果树）基因资源评价利用重点实验室开放课题（NYBY-202501-03）
*通信作者：周厚成 zhouhoucheng@caas.cn，朱庆松 zqs43@126.com

significantly higher green cotyledon rates and root lengths than wild-type plants. Physiological measurements indicated that, compared with wild-type, transgenic plants had significantly reduced malondialdehyde content and significantly increased levels of chlorophyll, proline, superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), and catalase (CAT). Moreover, the expression of salt stress-responsive genes, including *AtSOS1*, *AtSOS2*, *AtNHX1*, *AtHKT1*, *AtCOR15A*, and *AtRD29A*, were upregulated in the transgenic lines. 【Conclusion】 Overexpression of *FveTCP5* enhances salt tolerance in *A. thaliana* by promoting the expression of salt stress-responsive genes, suggesting that *FveTCP5* plays an important role in the salt stress response of strawberry.

Keywords: strawberry; TCP5; salt stress; bioinformatics analysis; transgenic *Arabidopsis*; gene expression; physiological and biochemical indices; functional analysis

草莓（*Fragaria* × *ananassa*）作为富含维生素C、抗氧化剂及多种微量元素的高营养价值浆果，凭借其酸甜可口的风味，深受消费者喜爱[1]。作为一种重要的经济作物，草莓的栽培范围已遍及全球，从设施化精准栽培到露地规模化种植模式并存[2]。目前，土壤盐渍化问题日益严重[3]，草莓对盐分较为敏感，土壤盐渍化严重阻碍草莓植株正常生长发育，致使果实产量与品质双双下降，已然成为影响草莓生长发育的最重要非生物胁迫之一[4]。因此，挖掘草莓相关耐盐候选基因并解析其生物功能具有重要意义。

TCP（Teosinte branched1/Cycloidea/Proliferating cell factors）是一类植物中独有的转录因子，命名源于最早鉴定的4个家族成员：玉米（*Zea mays*）中的TB1（TEOSINTE BRANCHED1），金鱼草（*Antirrhinum majus*）中的CYC（CYCLOIDEA），以及水稻（*Oryza sativa*）中的PCF1（PROLIFERATING CELL FACTOR1）和PCF2（PROLIFERATING CELL FACTOR2）。TCP家族蛋白含有一段约由59个氨基酸组成的碱性螺旋–环–螺旋（basic-helix-loop-helix，bHLH）保守区域，即TCP结构域。根据结构域序列的差异分为Class I（TCP-P）及Class II（TCP-C）2个亚家族，Class II与Class I相比，在TCP结构域中多了4个氨基酸[5]。目前，TCP家族成员已在拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）[6]、茄子（*Solanum melongena*）[7]、芹菜（*Apium graveolens*）[8]、石斛（*Dendrobium nobile*）[9]、野菊（*Chrysanthemum indicum*）[10]、花苜蓿（*Medicago ruthenica*）[11]、猕猴桃（*Actinidia chinensis*）[12]、栀子（*Gardenia jasminoides*）[13]、茶树（*Camellia sinensis*）[14]等植物中得到鉴定。TCP转录因子不仅在植物整个生长和发育进程中发挥着关键作用，而且在植物响应逆境胁迫过程中也具有重要调控功能。研究表明，拟南芥*AtTCP4/7/8/15*激活*CO*/*SOC1*的转录正向调控开花[15]，异源过表达苹果（*Malus domestica*）*MdTCP14*也可促进拟南芥开花[16]。拟南芥*AtTCP5*的过表达影响花瓣正常发育[17]，牡丹（*Paeonia* × *suffruticosa*）*PsTCP15a*通过下调花青素合成基因的表达来抑制花青素苷的积累[18]。*TaTCP21-A*负调控小麦（*Triticum aestivum*）耐寒性[19]，*BrTCP9*负调控白菜（*Brassica rapa*）镉耐受性[20]。野菊*CiTCP23*在拟南芥中异源表达，显著增强了其耐盐性[10]。过表达毛竹（*Phyllostachys edulis*）*PeTCP10*能提高转基因拟南芥对干旱和盐胁迫的耐受性[21]，月季（*Rosa chinensis*）*RcTCP9*在提高植物对干旱和盐胁迫的耐受性方面均发挥作用[22]。盐胁迫下，红树（*Avicennia marina*）*AmTCP8*不通过调控Na^+转运、Na/K比率、离子稳态相关基因和渗透调节相关基因表达来调节离子转运，而是作为负调控因子下调活性氧清除系统活性参与活性氧积累[23]。目前，在森林草莓（*F. vesca*）和栽培草莓中分别鉴定出18个和58个*TCP*基因家族成员[24]。研究表明，森林草莓*FveTCP9*通过调控ABA和花青素的生物合成来促进果实成熟[25]，*FaTCP11*参与草莓果实成熟过程和黄烷-3-醇的生物合成[26]。然而，关于草莓其他TCP家族成员功能的研究，还鲜有报道。前人用盐胁迫处理森林草莓，发现有11个*TCP*基因家族成员对盐胁迫有响应，其中LOC101297843基因的表达被诱导[27]，但其在盐胁迫中的直接功能尚属未知。

本研究以LOC101297843基因序列为参考，从森林草莓中克隆出拟南芥*AtTCP5*的同源基因*FveTCP5*，通过对*FveTCP5*进行生物信息学分析、组织表达分析，并在拟南芥中进行异源表达，测定转基因植株

在盐胁迫下的相关生理指标和基因表达量，分析*FveTCP5*在响应盐胁迫中的功能，为揭示TCP转录因子调控草莓耐盐分子机制和培育草莓耐盐新品种提供基因资源。

1　材料与方法

1.1　材料

供试材料为森林草莓‘Ruegen’，种植于信阳农林学院物联网温室内的草莓种质资源圃（北纬32.16°，东经114.12°），年平均温度16.5 ℃左右，采用常规的栽培管理。野生型拟南芥（Col-0），置于温度22 ℃，14 h光照/10 h黑暗的培养箱中培养。

1.2　方法

1.2.1　*FveTCP5*基因的克隆与过表达载体构建　取森林草莓的叶片，采用CTAB法提取总RNA，并反转录为cDNA。利用Primer 5.0设计*FveTCP5*基因CDS全长引物（附表1）进行PCR扩增，扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测，对目的条带进行纯化回收。利用一步定向克隆法将*FveTCP5*基因与pRI 101-AN载体连接，转化大肠杆菌，挑取阳性克隆测序验证，并命名为pRI 101-FveTCP5。通过冻融法，将重组质粒导入农杆菌GV3101中，挑取菌落进行PCR验证，并保存菌种。

1.2.2　FveTCP5的生物信息学分析　利用在线网站ExPASy-ProtParam tool（https://web.expasy.org/protparam/）和SMART（https://smart.embl.de/）分析FveTCP5蛋白理化性质和蛋白结构域，利用SOPMA（https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl page=npsa_sopma.html）和SWISS-MODEL（https://swissmodel.expasy.org/）分析FveTCP5蛋白的二级和三级结构。利用NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）下载FveTCP5的同源蛋白序列，利用MEGA 11软件构建不同物种TCP5蛋白的系统进化树，利用DNAMAN软件进行不同物种TCP5蛋白的多序列比对。

1.2.3　过表达*FveTCP5*拟南芥的获得　通过农杆菌介导的浸花法，将构建成功的pRI 101-FveTCP5重组质粒转化野生型拟南芥，收获种子后，经过75%乙醇消毒，置于含30 mg/L卡那霉素的1/2 MS培养皿中进行筛选，挑选抗性植株移植到营养土中继续培养，通过PCR扩增鉴定转基因植株。继续收取转基因拟南芥种子进行抗性筛选，直至收获T_3代纯合株系，采用荧光定量PCR检测转基因株系中*FveTCP5*基因的表达量。

1.2.4　拟南芥的盐胁迫处理　将消毒后的WT和T_3代种子分别播种于0和150 mmol/L NaCl的1/2 MS固体培养基中，水平放置培养14 d，统计子叶绿化情况。在0 mmol/L NaCl培养基中竖直培养7 d后，转移至150 mmol/L NaCl培养基中继续竖直培养7 d，拍照并记录植株的根长。每个处理重复3次。

1.2.5　拟南芥的生理指标测定　将在0 mmol/L NaCl培养基中萌发的幼苗移栽到营养土中继续培养20 d，以清水处理为对照，用150 mmol/L NaCl进行浇灌，每隔3 d浇灌一次，共处理3次，最后一次处理24 h后采集WT和转基因植株的叶片，参考刘畅等[28]的方法，测定叶绿素含量、丙二醛（MDA）含量、脯氨酸（Pro）含量、超氧化物歧化酶（SOD）活性、过氧化物酶（POD）活性和过氧化氢酶（CAT）活性，每个指标重复3次。

1.2.6　实时荧光定量PCR分析　以*Fve26S*为内参基因，收集处于果期的森林草莓根、茎、叶、花和果实，用来检测*FveTCP5*基因在不同组织中的表达模式。另外，以*AtACT2*为内参基因，检测正常培养和盐胁迫处理下WT和过表达*FveTCP5*拟南芥株系中盐胁迫响应基因的表达量变化。相关基因的相对表达量使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算，定量引物序列见附表1。

1.2.7　数据处理　采用Excel 2016对数据进行统计和图片绘制，利用IBM SPSS Statistics 27分析数据。数据以平均值±标准差表示，多组间比较使用Duncan法进行单因素方差分析，$P<0.05$表示差异显著。

2　结果

2.1　*FveTCP5*基因的克隆和蛋白的生物信息学分析

利用基因克隆引物对*FveTCP5*基因CDS全长序列进行扩增，经琼脂糖凝胶电泳，获得单一的目的条带（附图1-A）。经测序验证，该条带长度为1 131 bp（附图1-B）。FveTCP5蛋白由376个氨基酸组成，分子式为$C_{1792}H_{2809}N_{531}O_{575}S_{14}$，相对分子质量为41 441.07 Da，等电点为8.82，总平均亲水值为-0.649，为亲水性蛋白（附图1-C）；蛋白二级结构分析表明，该蛋白无规则卷曲占比较高，为86.97%，α-螺旋和延伸链分别占比为7.45%和5.59%，蛋白的三级结构如附图1-D。

在NCBI网站中利用BLAST对FveTCP5蛋白序列进行比对，获取11个物种的同源蛋白序列。系统进化分析表明，FveTCP5与蔷薇科其他成员中的TCP5蛋白亲缘关系较近（图1）。多序列比对分析表明，TCP5蛋白在森林草莓和其他11个物种中均含有保守TCP结构域（即bHLH结构域），进一步表明TCP5蛋白在进化过程中相对保守（附图2）。

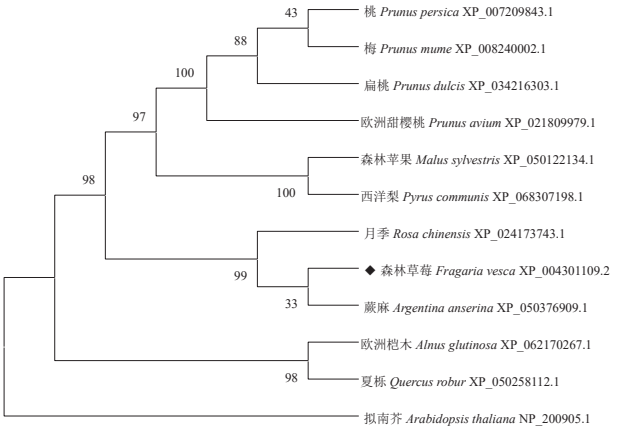


图1 不同物种TCP5蛋白的系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of TCP5 proteins in different species

2.2 *FveTCP5*基因的表达模式分析

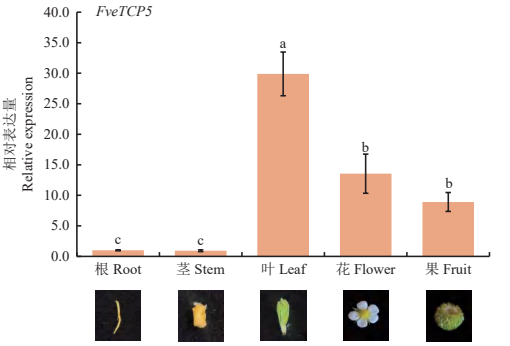
通过RT-qPCR分析*FveTCP5*基因在森林草莓各组织中的表达情况（图2），发现该基因在根、茎、叶、花、果中均普遍表达，在叶中的表达量最高，花中次之。

2.3 过表达*FveTCP5*拟南芥的鉴定

通过浸花法和抗性筛选获得转基因拟南芥，选取3个转基因株系进行PCR扩增验证，结果显示与目的条带大小一致（图3-A），并进一步利用RT-qPCR检测3个株系中*FveTCP5*基因的表达量，结果显示3个转基因株系的表达量均显著高于WT（图3-B），表明已成功获得过表达*FveTCP5*拟南芥株系，分别命名为OE1、OE2和OE3。

2.4 盐胁迫下过表达*FveTCP5*拟南芥的表型

将获得的3个转基因株系进行表型分析（图4-A、C），在正常培养条件下，WT和转基因株系的萌发率和根长均没有显著差异。在150 mmol/L NaCl处理下，WT和转基因株系的生长均受到抑制，但3个

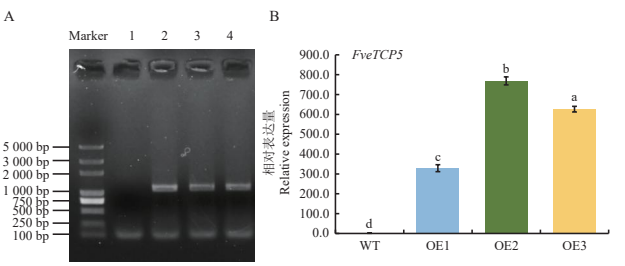


不同小写字母代表差异显著（$P<0.05$）。下同

Different lowercase letters indicate significant differences at $P<0.05$. The same below

图2 *FveTCP5*的表达模式分析

Fig. 2 Expression pattern analysis of *FveTCP5*



1：野生型拟南芥；2–4：3个转基因株系；WT：野生型拟南芥；OE1–3：3个转基因株系；下同

1: Wild type *A. thaliana*; 2–4: three transgenic lines. WT: Wild type *A. thaliana*; OE1–3: three transgenic lines. The same below

图3 过表达*FveTCP5*拟南芥的PCR鉴定（A）和基因表达量分析（B）

Fig. 3 PCR identification (A) and gene expression analysis (B) of *FveTCP5*-overexpressing *A. thaliana*

转基因株系的子叶绿化率分别较WT增加了27.78%、28.40%和37.66%（图4-B），根长也分别增加了0.40、0.44和0.70 cm（图4-D），均存在显著差异。结果初步表明，过表达*FveTCP5*可以提高拟南芥的耐盐性。

2.5 盐胁迫下过表达*FveTCP5*拟南芥的生理指标测定

清水处理下，WT和3个转基因株系的叶绿素、丙二醛和脯氨酸含量均无显著差异。在盐胁迫下，拟南芥叶绿素含量均有所降低，且转基因株系的含量高于WT（图5-A），分别较WT增加了25.14%、15.01%和17.30%，也进一步验证了过表达*FveTCP5*拟南芥的抗盐能力。盐胁迫后，3个转基因株系的丙二醛

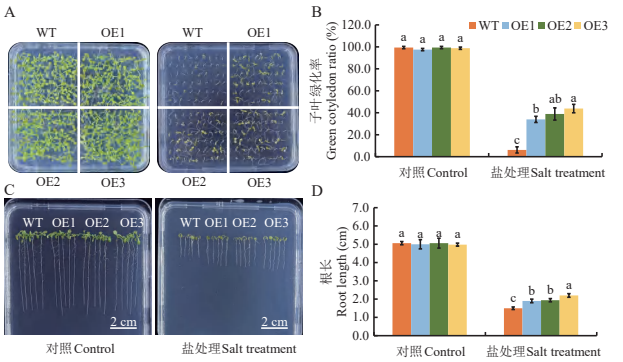


图4　转基因拟南芥的耐盐表型分析

Fig. 4　Analysis of salt tolerance phenotype of transgenic *A. thaliana*

含量较WT分别降低了18.76%、15.00%和12.80%（图5-B）；脯氨酸含量较WT分别升高了36.15%、27.83%和42.11%（图5-C）。表明*FveTCP5*可通过增强渗透调节能力来减轻盐胁迫对植株的伤害。

在清水处理下，WT和转基因株系的SOD、POD和CAT活性均无显著差异；而盐胁迫后，3个转基因株系的SOD活性较WT分别增加了52.78%、38.89%和58.33%，POD活性较WT分别增加了35.32%、29.08%和25.10%，CAT活性较WT分别增加了23.55%、19.38%和30.68%（图5-D–F）。以上结果表明，过表达*FveTCP5*可通过调节抗氧化酶活性来提高植株的耐盐性。

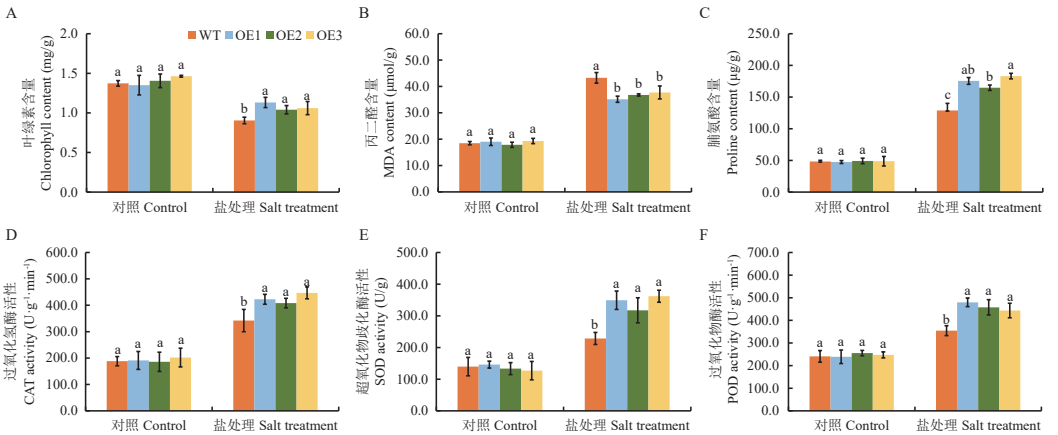


图5　转基因拟南芥在盐胁迫下的生理指标测定

Fig. 5　Determination of physiological indices of transgenic *A. thaliana* under salt stress

2.6　盐胁迫下过表达*FveTCP5*拟南芥中盐胁迫响应基因的表达分析

为进一步探究*FveTCP5*调控拟南芥耐盐的分子机制，检测了WT和转基因植株中盐胁迫响应相关基因的表达水平。结果显示，盐胁迫后，*AtSOS1*、*AtSOS2*、*AtNHX1*、*AtHKT1*、*AtCOR15A*和*AtRD29A*的表达量较WT均有不同程度的升高（图6），推测*FveTCP5*可通过提高上述盐胁迫响应基因的表达量，进而提高植株的耐盐性。

3　讨论

草莓在栽培过程中经常遇到各种非生物胁迫，如盐碱、干旱、低温等，而TCP转录因子在植物生长发育和逆境应答中发挥重要的调控作用[10]。本研究克隆了森林草莓*FveTCP5*基因，其编码376个氨基酸，含有1个保守TCP结构域；进化分析发现，TCP5蛋白在进化过程中相对保守，推测TCP5在不同物种中执行相似的功能。前人将海岛棉（*Gossypium barbadense*）*GbTCP5*在拟南芥中异源过表达，能够提高植株对盐胁迫的耐受性[29]，表明*FveTCP5*可能在调控盐胁迫中发挥作用。

本研究在拟南芥中过表达*FveTCP5*基因，发现其增强了转基因植株的耐盐性。盐胁迫下，转基因株系的叶绿素和脯氨酸含量均高于WT，与毛竹*PeTCP9*提高植株耐盐性的研究结果一致[30]。在逆境下，植物通过增加体内游离的脯氨酸含量平衡细胞代谢，稳定细胞内环境[31]。植物的抗氧化防御系统主要包括SOD、POD和CAT 3种关键酶类，可

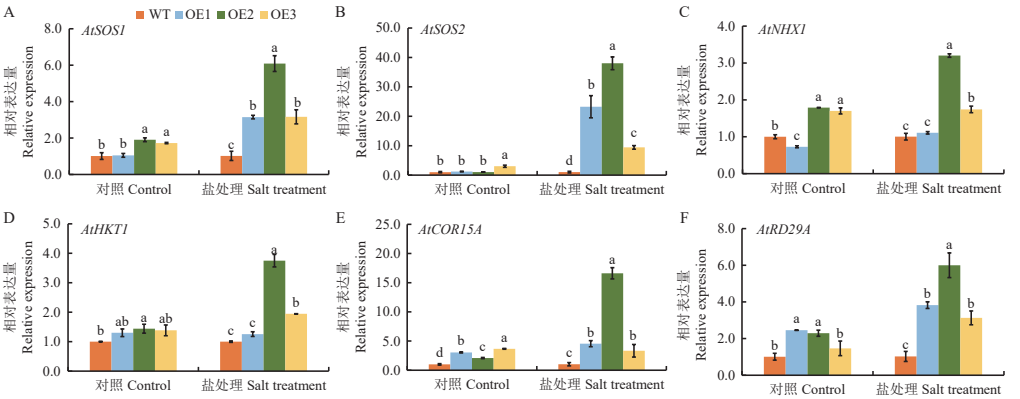


图6 转基因拟南芥中盐胁迫响应基因的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of salt stress-response genes in transgenic *A. thaliana*

通过协同作用清除细胞内过量的活性氧，在维持细胞氧化还原平衡、增强植物抗逆性等方面具有重要意义[32]。通过检测盐胁迫下拟南芥植株的抗氧化酶活性，发现转基因株系的SOD、POD和CAT的酶活性均显著高于WT，这与钟继亮[33]的研究结果相似，表明*FveTCP5*可以通过提高活性氧清除能力进而增强转基因拟南芥的耐盐性。

当植物遭受盐胁迫时，会激活各种信号传导途径来应对逆境，这些途径独立或共同作用，使植物能够适应或耐受盐胁迫[34]，其中细胞离子稳态的维持主要依赖于SOS（salt overly sensitive）信号通路[35]。SOS2作为SOS信号通路的核心调控因子，在盐胁迫下可通过磷酸化SOS1，促进Na^+外排。NHX1负责将细胞质中的Na^+区隔化到液泡内部以降低细胞毒性，HKT1负责木质部Na^+卸载等协同过程[36]。盐胁迫引发的渗透胁迫信号会激活DREB/CBF转录因子，这些转录因子结合*COR15A*和*RD29A*基因启动子上的DRE/CRT顺式作用元件，激活其表达来参与细胞保护机制[37]。前人研究发现，过表达*COR15A*基因能够增强拟南芥的耐盐性[38]，而*RD29A*的表达量则直观地反映了植物遭受的胁迫强度[39]。本研究中，异源过表达*FveTCP5*基因的拟南芥可通过上调*AtSOS1*、*AtSOS2*、*AtNHX1*、*AtHKT1*、*AtCOR15A*和*AtRD29A*的表达量来提高植株的耐盐性。本研究中设置的盐浓度主要基于前人的研究报道，杨娟博等[40]采用单一NaCl浓度（150 mmol/L）处理异源过表达草莓*FaGH3.17*基因的拟南芥植株，揭示了草莓*FaGH3.17*基因在耐盐性中的功能。不同浓度或时间梯度下，基因的表达模式及功能可能存在差异，低浓度或短时间处理可能触发适应性信号，而高浓度或长时间处理可能导致细胞损伤与代谢紊乱。本研究无法全面揭示*FveTCP5*在盐胁迫响应中的动态变化或剂量效应，是本研究的一个局限。后续在研究*FveTCP5*在草莓耐盐性中的功能时，需要增加剂量和时间梯度，对该基因的功能进行更系统的评价。此外，*FveTCP5*是否与其他蛋白互作来参与耐盐性还需进一步研究。

4 结论

克隆了森林草莓*FveTCP5*基因，编码376个氨基酸。盐胁迫下过表达*FveTCP5*拟南芥的子叶绿化率、根长、叶绿素、脯氨酸含量和抗氧化酶活性均显著高于野生型，并可通过调控盐胁迫响应相关基因的表达来增强植株的耐盐性，表明*FveTCP5*基因在植株响应盐胁迫中发挥功能。

文章所有附表数据请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260901164730_NewsFile_38.pdf）。

参考文献

[1] 卢东升, 刘汉光. 信阳草莓果牺真菌及其多样性研究 [J]. 信阳师范学院学报: 自然科学版, 2017(3): 374-378.
Lu DS, Liu HG. Studies on the fruit fungi and their diversity of *Fragaria ananassa* in Xinyang [J]. J Xinyang Norm Univ Nat Sci Ed, 2017(3): 374-378.

[2] 景天惠, 雷家军, 李贺, 等. 我国草莓生产现状与展望 [J]. 北方园艺, 2026(9): 154-161.
Jing TH, Lei JJ, Li H, et al. The status and prospect of strawberry production in China [J]. North Hortic, 2026(9): 154-161.

[3] 赵明德, 阴梦琪, 吉云. 盐碱胁迫下高寒牧草幼苗生理指标的响应 [J]. 信阳师范学院学报: 自然科学版, 2024, 37(4): 516-523.
Zhao MD, Yin MQ, Ji Y. Response of physiological indexes of alpine herbage seedlings under saline-alkali stress [J]. J Xinyang Norm Univ Nat Sci Ed, 2024, 37(4): 516-523.

[4] Ferreira JFS, Liu X, Suarez DL. Fruit yield and survival of five commercial strawberry cultivars under field cultivation and salinity stress [J]. Sci Hortic, 2019, 243: 401-410.

[5] He ZM, Zhou XM, Chen JM, et al. Identification of a consensus DNA-binding site for the TCP domain transcription factor TCP2 and its important roles in the growth and development of *Arabidopsis* [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(3): 2223-2233.

[6] Danisman S, van Dijk AD, Bimbo A, et al. Analysis of functional redundancies within the *Arabidopsis* TCP transcription factor family [J]. J Exp Bot, 2013, 64(18): 5673-5685.

[7] 梅文宇, 方燕芬, 宫超, 等. 茄子TCP转录因子的鉴定及胁迫处理下的表达分析 [J]. 广东农业科学, 2022, 49(12): 20-33.
Mei WY, Fang YF, Gong C, et al. Genome-wide identification and expression analysis in oxidative stress of TCP transcription factor family in eggplant (*Solanum melongena* L.) [J]. Guangdong Agric Sci, 2022, 49(12): 20-33.

[8] 周瑾, 李洁, 李晓燕, 等. 芹菜*TCP*基因家族全基因组鉴定、进化分析和表达研究 [J]. 四川农业大学学报, 2022, 40(2): 145-155.
Zhou J, Li J, Li XY, et al. Genome-wide identification, evolution and expression analysis of *TCP* gene family in celery (*Apium graveolens* L.) [J]. J Sichuan Agric Univ, 2022, 40(2): 145-155.

[9] Wei XR, Yuan M, Zheng BQ, et al. Genome-wide identification and characterization of *TCP* gene family in *Dendrobium nobile* and their role in perianth development [J]. Front Plant Sci, 2024, 15: 1352119.

[10] Huang LC, Bin J, Zhang YL, et al. Genome-wide characterization of *Chrysanthemum indicum TCP* genes reveals a positive role for CiTCP23 in salt response tolerance [J]. Ind Crops Prod, 2025, 225: 120567.

[11] 王苗苗, 赵相龙, 王召明, 等. 花苜蓿*TCP*基因家族的鉴定及其在干旱胁迫下的表达模式分析 [J]. 生物技术通报, 2025, 41(6): 179-190.
Wang MM, Zhao XL, Wang ZM, et al. Identification of *TCP* gene family in *Medicago ruthenica* and their expression pattern analysis under drought stress [J]. Biotechnol Bull, 2025, 41(6): 179-190.

[12] 宋姝熠, 蒋开秀, 刘欢艳, 等. '红阳'猕猴桃*TCP*基因家族鉴定及其在果实中的表达分析 [J]. 生物技术通报, 2025, 41(3): 190-201.
Song SY, Jiang KX, Liu HY, et al. Identification of the *TCP* gene family in *Actinidia chinensis* var. Hongyang and their expression analysis in fruit [J]. Biotechnol Bull, 2025, 41(3): 190-201.

[13] 林宇清, 朱渊铭, 陈丝雨, 等. 栀子*TCP*基因家族鉴定及响应盐胁迫表达模式分析 [J]. 江苏农业科学, 2025, 53(4): 126-132.
Lin YQ, Zhu YM, Chen SY, et al. Identification of *TCP* gene family in *Gardenia jasminoides* and analysis of expression patterns under salt stress [J]. Jiangsu Agric Sci, 2025, 53(4): 126-132.

[14] Yu SW, Li PH, Zhao XC, et al. CsTCPs regulate shoot tip development and catechin biosynthesis in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. Hortic Res, 2021, 8(1): 104.

[15] Liu J, Cheng XL, Liu P, et al. microRNA319-regulated TCPs interact with FBHs and PFT1 to activate CO transcription and control flowering time in *Arabidopsis* [J]. PLoS Genet, 2017, 13(5): e1006833.

[16] 杨慧茹. 苹果MdTCP14/15调控花芽孕育的功能与分子机制 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
Yang HR. Functional and molecular mechanisms of MdTCP14/15 in regulation of floral induction in apple (*Malus domestica*) [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2021.

[17] Li J, Wang YZ, Zhang YX, et al. RABBIT EARS regulates the transcription of TCP4 during petal development in *Arabidopsis* [J]. J Exp Bot, 2016, 67(22): 6473-6480.

[18] 韩新蕊, 袁欣, 高杰, 等. 牡丹*TCP*基因家族鉴定及TCP15a功能分析 [J]. 植物学报, 2026, 61(1): 37-52.
Han XR, Yuan X, Gao J, et al. Identification of *TCP* gene family and functional analysis of TCP15a of tree peony [J]. Bull Bot, 2026, 61(1): 37-52.

[19] Peng KK, Ren ZP, Wang SN, et al. TaTCP21-a negatively regulates wheat cold tolerance via repressing expression of *TaDREB1C* [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 219: 109353.

[20] Qin HY, Zeng JJ, He XR, et al. *Salvia miltiorrhiza*-derived carbon dots alleviate cadmium stress in flowering Chinese cabbage by suppressing BrTCP9-mediated cadmium transport and reactive oxygen species metabolism [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 228: 110240.

[21] 刘欢龙. 毛竹TCP转录因子的鉴定及*PeTCP10*基因的功能分析 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2020.
Liu HL. Identification of TCP transcription factors in moso bamboo and function analysis of *PeTCP10* [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2020.

[22] 董炫克, 李映旸, 马豫皖, 等. 月季'月月红'*RcTCP9*基因在盐和干旱胁迫中的功能分析 [J]. 园艺学报, 2025, 52(7): 1789-1802.
Dong XK, Li YY, Ma YW, et al. The functional analysis of *RcTCP9* gene in response to salt and drought stress in *Rosa chinensis* 'Yueyuehong' [J]. Acta Hortic Sin, 2025, 52(7): 1789-1802.

[23] Li QH, Tang HC, Zhuang LH, et al. AmTCP8 is a negative regulatory factor for salt tolerance in mangrove *Avicennia marina* by driving *AmLOX3* expression to promote ROS accumulation [J]. Ind Crops Prod, 2024, 220: 119170.

[24] 张志强, 卢世雄, 马宗桓, 等. 草莓*TCP*转录因子家族生物信息学鉴定及基因表达分析 [J]. 西北植物学报, 2020, 40(12): 2031-2043.
Zhang ZQ, Lu SX, Ma ZH, et al. Bioinformatics identification and expression analysis of *TCP* transcription factor family in strawberry [J]. Acta Bot Boreali Occidentalia Sin, 2020, 40(12): 2031-2043.

[25] Xie YG, Ma YY, Bi PP, et al. Transcription factor FvTCP9 promotes strawberry fruit ripening by regulating the biosynthesis of abscisic acid and anthocyanins [J]. Plant Physiol Biochem, 2020, 146: 374-383.

[26] Pillet J, Yu HW, Chambers AH, et al. Identification of candidate flavonoid pathway genes using transcriptome correlation network analysis in ripe strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) fruits [J]. J Exp Bot, 2015, 66(15): 4455-4467.

[27] Wei W, Hu Y, Cui MY, et al. Identification and transcript analysis of the TCP transcription factors in the diploid woodland strawberry *Fragaria vesca* [J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 1937.

[28] 刘畅, 张宇, 李梦妤, 等. 菜豆*PvLEA*基因的克隆及耐盐功能鉴定 [J]. 中国农学通报, 2025, 41(5): 44-49.
Liu C, Zhang Y, Li MY, et al. Cloning of *PvLEA* gene in snap bean and identification of salt tolerance function [J]. Chin Agric Sci Bull, 2025, 41(5): 44-49.

[29] Wang Y, Yu YH, Wan HN, et al. Sea-island cotton (*Gossypium barbadense* L.) GbTCP5 improves plant adaptation to drought and salt stress by directly activating GbERD7, GbUBC19, and GbGOLS2 expression [J]. Ind Crops Prod, 2023, 203: 117209.

[30] 许玉增. 毛竹*PheTCP9*基因的耐盐性功能研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2022.
Xu YZ. Salt tolerance functional analysis of *Phyllostachys edulis PheTCP9* gene [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2022.

[31] 张彤彤, 郑登俞, 吴忠义, 等. 玉米NF-Y转录因子基因*ZmNF-YB13*响应干旱和盐胁迫的功能分析 [J]. 生物技术通报, 2022, 38(10): 115-123.
Zhang TT, Zheng DY, Wu ZY, et al. Functional analysis of *ZmNF-YB13* responding to drought and salt stress [J]. Biotechnol Bull, 2022, 38(10): 115-123.

[32] 杨克明, 李海峰, 胡西旦·买买提, 等. 调环酸钙对高温胁迫下甜瓜生理生长及产量品质的影响 [J]. 华北农学报, 2025, 40(4): 85-95.
Yang KM, Li HF, Huxidan M, et al. The effect of prohexadione-calcium on physiological growth, yield and quality of cantaloupe under high temperature stress [J]. Acta Agric Boreali Sin, 2025, 40(4): 85-95.

[33] 钟继亮. 森林草莓*FvMYB82*基因的克隆与功能分析 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2023.
Zhong JL. Isolation and functional analysis of *FvMYB82* gene in *Fragaria vesca* L. [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2023.

[34] Zhou HP, Shi HF, Yang YQ, et al. Insights into plant salt stress signaling and tolerance [J]. J Genet Genom, 2024, 51(1): 16-34.

[35] Ali A, Petrov V, Yun DJ, et al. Revisiting plant salt tolerance: novel components of the SOS pathway [J]. Trends Plant Sci, 2023, 28(9): 1060-1069.

[36] Liu GY, Yu X, Zeng YL, et al. SOS2-FREE1 regulates SOS1 tonoplast sorting to promote Na^+ compartmentalization in vacuole during salt stress response [J]. J Integr Plant Biol, 2025, 67(10): 2545-2560.

[37] 刘坤, 李国婧, 杨杞. 参与植物非生物逆境响应的DREB/CBF转录因子研究进展 [J]. 生物技术通报, 2022, 38(5): 201-214.
Liu K, Li GJ, Yang Q. Research progress in DREB/CBF transcription factor involved in responses in plant to abiotic stress [J]. Biotechnol Bull, 2022, 38(5): 201-214.

[38] Song C, Je J, Hong JK, et al. Ectopic expression of an *Arabidopsis* dehydration-responsive element-binding factor DREB2C improves salt stress tolerance in crucifers [J]. Plant Cell Rep, 2014, 33(8): 1239-1254.

[39] Narusaka Y, Nakashima K, Shinwari ZK, et al. Interaction between two *cis*-acting elements, ABRE and DRE in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses [J]. Plant J, 2003, 34(2): 137-148.

[40] 杨娟博, 郭丽丽, 卢世雄, 等. 草莓*FaGH3.17*基因的克隆及功能分析 [J]. 园艺学报, 2024, 51(11): 2483-2494.
Yang JB, Guo LL, Lu SX, et al. Cloning and functional analysis of *FaGH3.17* gene in strawberry [J]. Acta Hortic Sin, 2024, 51(11): 2483-2494.

（责任编辑　高洁）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):177-187

不同转化方法介导高温胁迫下枇杷果实*EjHSFB-2a*过表达效率比较

牛洁 汪红霞 任艺华 易鹏翰 周佳 孟鹏蕊 邓群仙* 张慧芬*
（四川农业大学园艺学院，成都 611130）

摘 要：【目的】探究不同转化方法介导的*EjHSFB-2a*瞬时过表达对转色期枇杷果实耐热性的影响，为枇杷抗逆功能基因组学研究及育种提供技术依据。【方法】分别采用果柄注射法、果面注射法及真空渗透法3种转化方法导入pC1300-*EjHSFB-2a*过表达载体，45 ℃高温胁迫7 h后，通过测定基因表达水平、丙二醛含量、过氧化氢含量、超氧阴离子产生速率及抗氧化酶活性，比较3种转化方法的差异。【结果】3种处理方法均不同程度地降低了果实热害指数与热害发生率。RT-qPCR分析证实，所有方法均能在果肉组织中成功过表达*EjHSFB-2a*，而仅果面注射法在果皮中有效转化。在果肉组织中，3种方法均显著降低了MDA、H_2O_2和O_2^-的积累，其中真空渗透法对MDA和H_2O_2的抑制效果最佳，降幅分别为43.33%和7.82%；果面注射法对O_2^-的清除能力最强，降幅达29.70%。此外，3种处理均提升了果肉中SOD、POD和CAT的活性。【结论】3种转化方法均可通过*EjHSFB-2a*过表达增强枇杷果肉的耐热性。不同转化方法对抗高温胁迫的调控效果具有组织特异性，转化效率由高到低依次为果面注射法＞真空渗透法＞果柄注射法，其中果面注射法是鉴定果皮及果肉组织基因功能的最适方法。

关键词：枇杷；高温胁迫；*EjHSFB-2a*；瞬时转化；果面注射法；真空渗透法；果柄注射法；生理效应
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1341

Comparison of the Efficiency of Different Transformation Methods for Mediating *EjHSFB-2a* Overexpression in Loquat Fruit under High-temperature Stress

NIU Jie WANG Hong-xia REN Yi-hua YI Peng-han ZHOU Jia MENG Peng-rui DENG Qun-xian*
ZHANG Hui-fen*
(*College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu* 611130)

Abstract: 【Objective】To explore the effects of transient overexpression of *EjHSFB-2a* on enhancing the heat tolerance of loquat fruit at the turning-color stage, thereby providing a technical basis for stress-resistant functional genomics and breeding in loquat. 【Method】The pC1300-*EjHSFB-2a* overexpression vector was introduced using three transformation methods: fruit stalk injection, fruit surface injection, and vacuum infiltration. After exposure to high-temperature stress at 45 ℃ for 7 h, the differences among the three methods were compared by measuring gene expression levels, malondialdehyde content, hydrogen peroxide content, superoxide anion production rate, and antioxidant enzyme activities. 【Result】All three treatment methods reduced the heat injury index and incidence to varying degrees. RT-qPCR analysis confirmed that all methods successfully overexpressed *EjHSFB-2a* in the flesh tissue, while only fruit surface injection achieved effective transformation in the peel. In the flesh tissue, all three methods significantly reduced the accumulation of MDA, H_2O_2 and O_2^-. Among them, vacuum infiltration was most effective in suppressing MDA and H_2O_2, with reductions of 43.33% and 7.82%, respectively. Fruit surface injection showed the strongest scavenging capacity for O_2^-, with a reduction of 29.70%. Furthermore, all three treatments enhanced the

收稿日期：2025-12-10
基金项目：四川省科学技术厅“十四五”育种攻关项目（2021YFYZ0023），国家现代农业产业技术体系四川省水果创新团队项目（SCCXTD -2024-4）
*通信作者：邓群仙 dengqx@sicau.edu.cn，张慧芬 hfcheung@sicau.edu.cn

activities of SOD, POD and CAT in the flesh tissue.【Conclusion】All three transformation methods enhanced the thermotolerance of loquat flesh via *EjHSFB-2a* overexpression. The regulatory effects of different transformation methods on resistance to high-temperature stress exhibited tissue specificity, with transformation efficiency ranking from high to low as fruit surface injection > vacuum infiltration > fruit stalk injection. Among these, fruit surface injection is the most suitable method for functional gene identification in both peel and flesh tissues.

Keywords: loquat; high temperature stress; *EjHSFB-2a*; transient transformation; fruit surface injection; vacuum infiltration; fruit stalk injection; physiological effects

枇杷（*Eriobotrya japonica* Lindl.）为蔷薇科枇杷属植物，属亚热带常绿果树，喜温暖湿润的气候。四川省地域辽阔，气候多样，加之得天独厚的地理条件，使得四川省成为枇杷种质资源的密集分布区之一，拥有丰富的枇杷种质资源[1]。枇杷果实口感多汁，味甜清香，含有多种维生素、矿物质等营养成分，广受消费者欢迎。然而近年来随着全球气候变暖，温室效应加剧，高温胁迫成为制约果树产业健康发展的主要因素之一[2]。

枇杷果皮较薄，果肉柔嫩多汁，在枇杷果实转色期前后，如遇高温，果面温度达到30 ℃以上时，果实极易发生热害，受热害后果实表面会出现褐色不规则斑块[3]，影响优质商品果的生产。高温胁迫会引发氧化应激，导致细胞内产生过多的活性氧物质，从而损害细胞结构和功能[4]。邓朝军等[5]通过对‘红种’枇杷果皮热伤害的抗氧化特性进行研究发现，高温处理增加了果皮丙二醛、超氧阴离子含量，降低了抗氧化酶活性。同时高温胁迫会造成枇杷果皮细胞角质层变薄，表皮细胞变形，并使细胞壁厚度增加[6]。潘德灼等[7]通过比较不同抗热性枇杷果皮的差异蛋白表达模式发现，需要一定量的HSP以维持蛋白的正确折叠和正常功能，从而提高枇杷果实耐热性。果实作为一个庞大的代谢库，由于低的表面积/体积比，蒸发失水、散热较慢，在较高的外界温度下果实即成为一个热库，果皮和果肉温度明显高于气温[8]，因此果实对温度变化更为敏感。一旦发生热害，不仅影响果实的外观品质，还会降低果实口感和营养价值，降低果实的市场竞争力，使果实丧失商品性[9]。

高温胁迫会激活一些特定的转录因子，调控一系列与逆境响应相关的基因表达，如热诱导基因*HSFA1*、*HSFA2*、*HSFA7a*、*HSFBs*和*HSPs*[10]。枇杷果实中大多数*HSPs*相关基因表达水平受高温诱导上调[11]，而*HSPs*基因的转录又受到HSFs的调控[12]。HSFs是植物响应高温胁迫的关键调节因子，根据其寡聚化结构域（OD）的差异可分为HSFA、HSFB和HSFC 3类[13]。Li等[14]研究发现高温胁迫能够诱导百合（*Lilium brownie* var. *viridulum* Baker）花瓣盘中*LdHSFB2a*的表达。进一步的功能验证表明，瞬时过表达*LdHSFB2a*能够显著降低细胞的相对电导率和过氧化氢（H_2O_2）含量，并有效提升过氧化氢酶（CAT）活性。本课题组前期通过转录组学数据筛选到枇杷*EjHSFB-2a*在高温诱导下表达水平上调，推测其可能参与枇杷果实的热胁迫响应。但目前，其在转色期枇杷果实中过表达后是否能够提升果实抗高温胁迫的能力，仍缺乏直接的遗传证据。

遗传转化是解析基因功能与实现作物性状定向改良的核心技术。然而，在枇杷等果树中，稳定的遗传转化体系构建困难，而且果树童期长，严重制约了果实中基因的功能研究。瞬时转化技术作为一种快速、灵活的研究手段，为在果实发育阶段进行基因功能验证提供了可行性。Chi等[15]使用果面注射法在枇杷果实中分别瞬时过表达*EjNI*、*EjtDT2*，发现*EjNI*过表达增加了中性倒转酶的活性，从而促进蔗糖转化为果糖和葡萄糖。*EjtDT2*的过表达促进了苹果酸的积累。Zhang等[16]使用果柄注射法在枇杷幼果中瞬时过表达*EjS6PDH1*、*EjS6PDH4*，提高了幼果抗寒性。吴艳菊等[17]利用真空渗透法在紫花苜蓿（*Medicago sativa* L.）发芽种子中成功瞬时过表达*GUS*基因。在无花果（*Ficus carica* L.）果实中使用瞬时注射法过表达*FcERF100*，能够显著延缓果实软化并降低果胶裂解酶活性[18]。目前，虽已有多种瞬时转化方法应用于果实体系，但其转化效率、组织特异性及对复杂器官（如整果）的适用性仍缺乏系统评估与比较，制约了该技术在果实基因功能研究中的准确性与普适性。并且关于不同瞬时转化方式在效率、组织特异性及对枇杷果实损伤程度等

方面的研究有待开展。

本研究使用果柄注射法、果面注射法及真空渗透法3种转化方法，在枇杷果实中瞬时过表达*EjHSFB-2a*基因，比较3种转化方法效率差异及其对枇杷果实耐热性的影响。以期筛选出可用于高效介导*EjHSFB-2a*过表达的遗传转化方法，对推进枇杷功能基因组学研究及抗逆育种具有重要意义。

1　材料与方法

1.1　材料

试验材料为种植于四川农业大学园艺学院枇杷种质资源圃（北纬30°56′，东经103°65′，海拔496.9 m）‘2016-6-2’枇杷转色期果实。挑选果实大小一致、无病虫害及机械损伤的枇杷转色期果穗，带回实验室先进行水培，后续分别采用果柄注射法、果面注射法及真空渗透法3种转化方法瞬时过表达*EjHSFB-2a*。

1.2　方法

1.2.1　试验设计　本研究采用3种转化方法进行*EjHSFB-2a*基因的瞬时过表达：果柄注射法、果面注射法及真空渗透法。3种转化方法各选取20个大小、成熟度一致的果实进行*EjHSFB-2a*瞬时过表达，并各另设20个果实注射pC1300空载作为相应的对照组。具体操作如下：（1）果柄注射法：使用一次性无菌注射器（成都浩博优科技有限公司），于果柄（连接果实与果梗的部位）进行注射。沿果实生长方向，正反两侧各注射一次，每次注入pC1300-*EjHSFB-2a*菌液0.5 mL。pC1300空载对照处理同上。（2）果面注射法：在果实赤道部位均匀选取3个注射点，使用一次性无菌注射器于每个注射点注入pC1300-*EjHSFB-2a*菌液0.3 mL。pC1300空载对照处理同上。（3）真空渗透法：在果实表面使用2.5 mL一次性注射器（不带针头）尖端均匀按压4个圆孔，后将果穗倒置于装有菌液的塑料烧杯，使果实完全浸泡在pC1300-*EjHSFB-2a*菌液中，随即放于真空干燥器中，使用SHZ-D(III)循环水式真空泵进行真空渗透，压力值达到0.08 MPa，处理时间为10 min。pC1300空载对照处理同上。转化后培养3 d，在智能人工气候箱（RQH-350）中进行高温处理，条件设置为：温度45 ℃、相对湿度40%、光照10 450 lx、时间7 h。果柄注射法取样部位为自果实果蒂到果柄方向均匀取3条0.5 cm宽的果皮及相应位置的果肉；果面注射法取样部位为注射孔周围0.5 cm宽的果皮及相应位置的果肉；真空渗透法取样部位为按压圆孔周围0.5 cm宽的果皮及相应位置的果肉。为准确评估转化成功率并减少检测误差，将每种方法所取样品随机分为3份，并迅速置于液氮冷冻，保存于-80 ℃超低温冰箱进行后续基因表达水平与生理指标测定。

1.2.2　*EjHSFB-2a*基因克隆与过表达载体构建　从‘大五星’枇杷基因组[19]提取*EjHSFB-2a*（EVM0039834）序列信息，根据引物设计原则，使用SnapGene软件设计出克隆引物，引物送至擎科生物科技有限公司合成（引物序列见附表1）。以枇杷果实的cDNA为模板扩增*EjHSFB-2a*基因的全长编码序列，PCR扩增体系和反应程序参考TSINGKE TSE101金牌Mix（green）试剂盒说明书（北京擎科生物公司），PCR产物进行凝胶电泳检测，选择正确的条带进行胶回收，回收步骤见胶回收试剂盒（北京擎科生物公司），将回收的目的片段与T载体连接，连接体系参考pClone007 Blunt Simple Vector试剂盒说明书（北京擎科生物公司），PCR仪25 ℃连接30 min。连接后立即进行转化，将10 μL连接产物转入30–50 μL DH5α感受态（冰上进行），冰上静置30 min，42 ℃热激90 s，冰上冷却3 min，超净工作台中加入1 mL LB液体培养基（无抗性），37 ℃活化摇菌1 h，4 000 × *g*离心3 min，随后在超净工作台中涂板，去上清液，保留50 μL吹打均匀，移取到固体培养基（含Amp）上加玻璃珠摇晃均匀，倒掉玻璃珠，将培养皿封口后37 ℃培养箱倒置培养过夜。用黄色枪头挑取8个单菌落加入到1 mL含Amp的液体培养基中，活化摇菌至菌液浑浊（约5–6 h）。摇菌后进行菌液PCR检测，PCR体系和反应程序参考TSINGKE TSE004，Master Mix（blue）试剂盒说明书（北京擎科生物公司），将PCR产物进行凝胶电泳，选择电泳位置正确的条带进行测序，测序成功的保存质粒。以测序成功的克隆质粒为模板，使用带有同源臂的引物进行*EjHSFB-2a*扩增（引物序列见附表1），将枇杷*EjHSFB-2a*的全长CDS重组到*Bam*H I酶与*Kpn* I酶线性化的pC1300载体上，以空载pC1300为对照，操作步骤参考ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit V3试剂盒说明书（南京诺唯赞生

物科技股份有限公司）。将pC1300-*EjHSFB-2a*及pC1300空载分别转化至农杆菌GV3101中，按照不同转化方法转化枇杷果实（方法详见1.2.1）。

1.2.3 测定指标及方法 将3种转化方法过表达*EjHSFB-2a*的枇杷果实于45 ℃高温处理后，分别统计果实的热害发生率及热害指数，并测定膜脂过氧化与抗氧化酶等相关指标。热害发生率（%）=热害果数/调查总果数×100%。枇杷果实热害指数评定分为5级[5]，评定标准如下：0级，无褐色斑块，0%；1级，褐斑面积≤10%；2级，10%＜褐斑面积≤25%；3级，25%＜褐斑面积≤50%；4级，褐斑面积＞50%。热害指数计算公式为：

热害指数（%）=∑（各级病果数×各级代表值）/（调查总数×最高级代表值）×100%。

丙二醛（MDA）含量的测定采用硫代巴比妥酸法[20]，H_2O_2含量测定采用四氯化钛法[21]，采用羟胺氧化的方法[22]测定O_2^-的产生速率。SOD活性测定参考Rao等[23]氮蓝四唑的方法，POD活性采用愈创木酚法[24]测定，CAT活性测定参考Aghdam等[25]的方法。

不同转化方法的综合评价参考张钰林等[26]隶属函数法，计算3种转化方法介导*EjHSFB-2a*过表达在高温胁迫下各评价指标的平均隶属函数值，以此为不同方法的综合隶属函数值。综合隶属函数值越高，说明该种转化方法介导*EjHSFB-2a*过表达后枇杷果实的耐热性越强，计算公式如下：

若测定指标与耐热性呈正相关，$U(X_j)=(X_j-X_{min})/(X_{max}-X_{min})$；

若测定指标与耐热性呈负相关，$U(X_j)=1-(X_j-X_{min})/(X_{max}-X_{min})$；

其中，$U(X_j)$为第j个测定指标的隶属函数值，X_j为第j个测定指标测定值，X_{min}为所有测定指标最小值，X_{max}为所有测定指标最大值。

RNA提取采用CTAB法[27]并加以改进。逆转录使用Goldenstar™ RT 6 cDNA Synthesis Ver.2反转录试剂盒（北京擎科生物公司）。实时荧光定量PCR（RT-qPCR）引物设计使用Beacon Designer 7.0，具体引物信息见附表1，引物委托擎科生物公司合成。采用SYBR® Premix Ex Taq™ II试剂盒（北京擎科生物公司）在CFX 96型PCR仪（Bio-rad，美国）进行扩增，反应体系和反应程序参考试剂盒说明书。用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因的相对表达量，每个样品重复3次。

1.2.4 数据统计与分析 数据统计使用Excel 2019；图表使用GraphPad Prism 9.5绘制；方差分析采用IBM SPSS Statistics 25完成。

2 结果

2.1 不同转化方法对高温胁迫下枇杷果实热害发生的影响

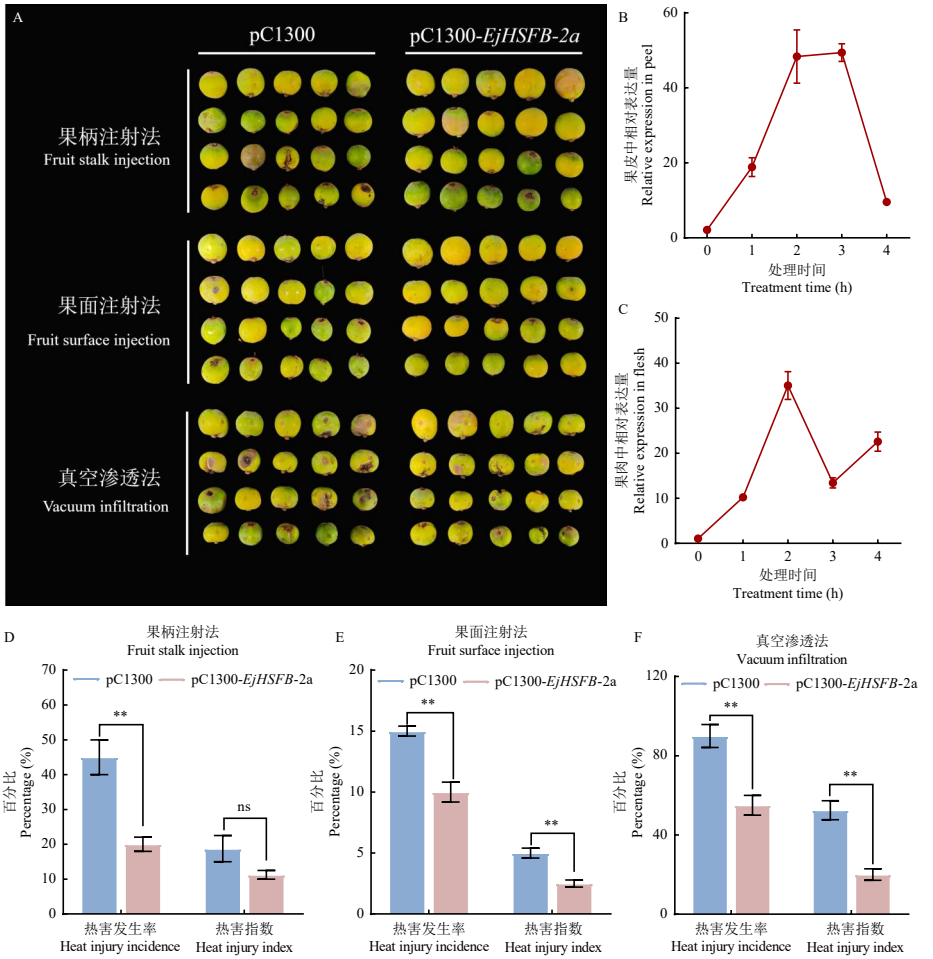
高温胁迫下枇杷果实基因表达分析发现，果皮与果肉中*EjHSFB-2a*均能快速响应胁迫，表达量提升（图1-B、C）。经3种不同转化方法进行*EjHSFB-2a*瞬时过表达的枇杷果实，在45 ℃高温胁迫下呈现出不同程度的热损伤表型，但均较对应空载更轻（图1-A）。在空载组中，果面注射法的热害发生率最低，仅为15.00%，真空渗透法的热害发生率最高，为90.00%。与空载组相比，3种方法在缓解热害方面效果不同，其中真空渗透法效果最为明显，其热害指数降低了61.90%，果面注射法次之，热害指数降低了50.00%，果柄注射法最低，热害指数降低了40.00%（图1-D–F）。

2.2 不同转化方法对高温胁迫下枇杷果实*EjHSFB-2a*相对表达量的影响

本研究通过RT-qPCR检测*EjHSFB-2a*基因在各处理组中的相对表达量，以判断基因是否瞬时转化成功。3种不同的转化方法在实现*EjHSFB-2a*基因瞬时表达方面，呈现出显著的组织特异性与效率差异（图2）。果柄注射法3组样品中，仅1份果肉样本*EjHSFB-2a*表达量显著提升，其表达水平为对照的4.07倍（图2-C）；果面注射法3组样本中，2份果皮样品及对应的果肉样本中*EjHSFB-2a*表达量显著提升（图2-D、F）；真空渗透法3组样本中，仅2份果肉样本*EjHSFB-2a*表达量显著提升（图2-G、I）。转化成功率分析显示，仅果面注射法在果皮组织中的转化效率高（2/3样品成功）（图2-J）。在果肉组织中，果面注射法与真空渗透法均展现出较高的转化效率（2/3样品成功），优于果柄注射法（仅1/3样品成功）（图2-K）。

2.3 不同转化方法对高温胁迫下枇杷果实细胞膜损伤程度的影响

通过3种转化方法过表达*EjHSFB-2a*，对高温胁



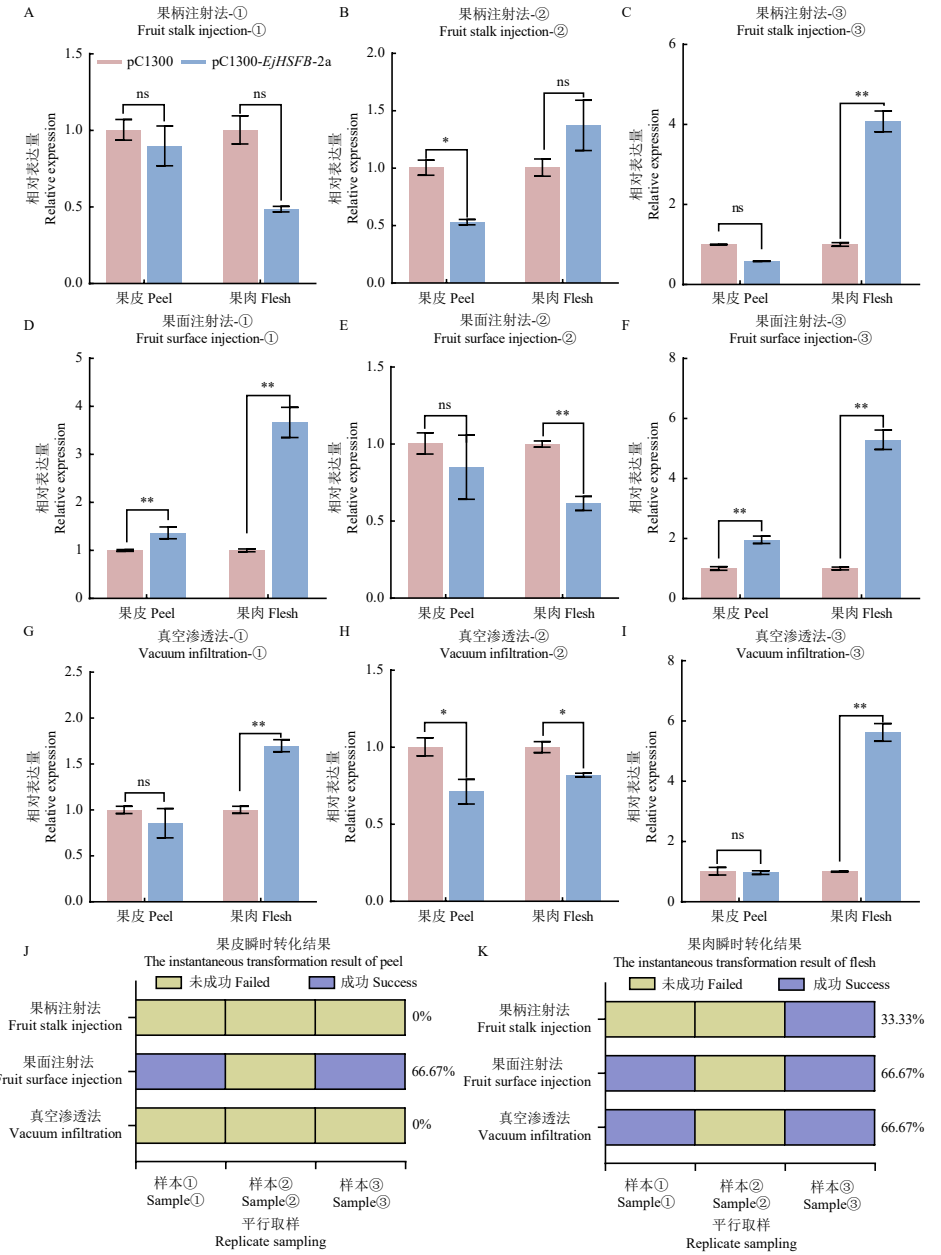
A：不同转化方法过表达*EjHSFB-2a*后表型变化；B：45 ℃高温处理4 h果皮中*EjHSFB-2a*相对表达量变化；C：45 ℃高温处理4 h果肉中*EjHSFB-2a*相对表达量变化；D–F：果柄注射法（D）、果面注射法（E）、真空渗透法（F）过表达*EjHSFB-2a*热害发生率与热害指数；* $P<0.05$，** $P<0.01$。下同

A: Phenotypic changes after overexpression of *EjHSFB-2a* via different transformation methods. B: Relative expression level of *EjHSFB-2a* in peel after 4 h of high-temperature stress at 45 ℃. C: Relative expression level of *EjHSFB-2a* in flesh after 4 h of high-temperature stress at 45 ℃. D–F: Heat injury incidence and index after overexpression of *EjHSFB-2a* via fruit stalk injection (D), fruit surface injection (E), and vacuum infiltration (F). * $P<0.05$, ** $P<0.01$. The same below

图1　不同转化方法对高温胁迫下枇杷果实表型的影响

Fig. 1　Effects of different transformation methods on the phenotype of loquat fruits under high temperature stress

迫下枇杷果实细胞膜损伤的缓解效果存在显著差异，且具有组织特异性（图3）。*EjHSFB-2a*过表达有效减轻了细胞膜脂过氧化程度。在果肉组织中，真空渗透法的效果最为显著，使MDA含量较空载对照降低了43.43%（图3-C）；果柄注射法亦能显著降低MDA含量（降幅22.53%）（图3-A）。与之相比，果面注射法在果皮与果肉组织中均表现出显著效果，MDA含量分别降低了23.09%和34.63%（图3-B）。对于H_2O_2的积累，不同处理的影响各异。在果皮组织中，仅果面注射法能显著降低H_2O_2含量，降幅高达59.12%（图3-E）。而在果肉组织中，虽然3种方法均观察到H_2O_2含量的下降，但仅真空渗透法达到统计学显著水平，较对照显著降低了7.82%（图3-F）。同时，对比不同转化方法下枇杷果实的超氧阴离子产生速率发现，结果与H_2O_2类似。果面注射法在果皮组织中表现出独特的优势，使O_2^-产生速率显著降低了19.60%（图3-H）。在果肉组织中，3种方法均能降低O_2^-水平，其中果柄注射法与果面注射法的降低幅度较大，分别为28.01%和29.70%（图3-G–H），而真空渗透法则降低了12.86%（图3-I）。



A–C：果柄注射法过表达 *EjHSFB-2a* 后 3 份样本 RT-qPCR 检测结果；D–F：果面注射法过表达 *EjHSFB-2a* 后 3 份样本 RT-qPCR 检测结果；G–I：真空渗透法过表达 *EjHSFB-2a* 后 3 份样本 RT-qPCR 检测结果；J–K：不同转化方式在果皮(J)和果肉(K)中转化成功率

A–C: RT-qPCR results of three replicate samples after overexpression of *EjHSFB-2a* via fruit stalk injection. D–F: RT-qPCR results of three replicate samples after overexpression of *EjHSFB-2a* via fruit surface injection. G–I: RT-qPCR results of three replicate samples after overexpression of *EjHSFB-2a* via vacuum infiltration. J–K: Transformation success rates in peel (J) and flesh (K) for different transformation methods

图 2 不同转化方法转化后枇杷果实中 *EjHSFB-2a* 相对表达量

Fig. 2 Relative expression of *EjHSFB-2a* in loquat fruit after different transformation methods

2.4 不同转化方法对高温胁迫下枇杷果实抗氧化酶活性的影响

为明确在高温胁迫下不同转化方法对枇杷果实抗氧化系统的调控作用，测定SOD、POD、CAT 3种抗氧化酶活性在不同处理中的变化情况（图4）。结果表明，与空载对照相比，果柄注射法与真空渗透

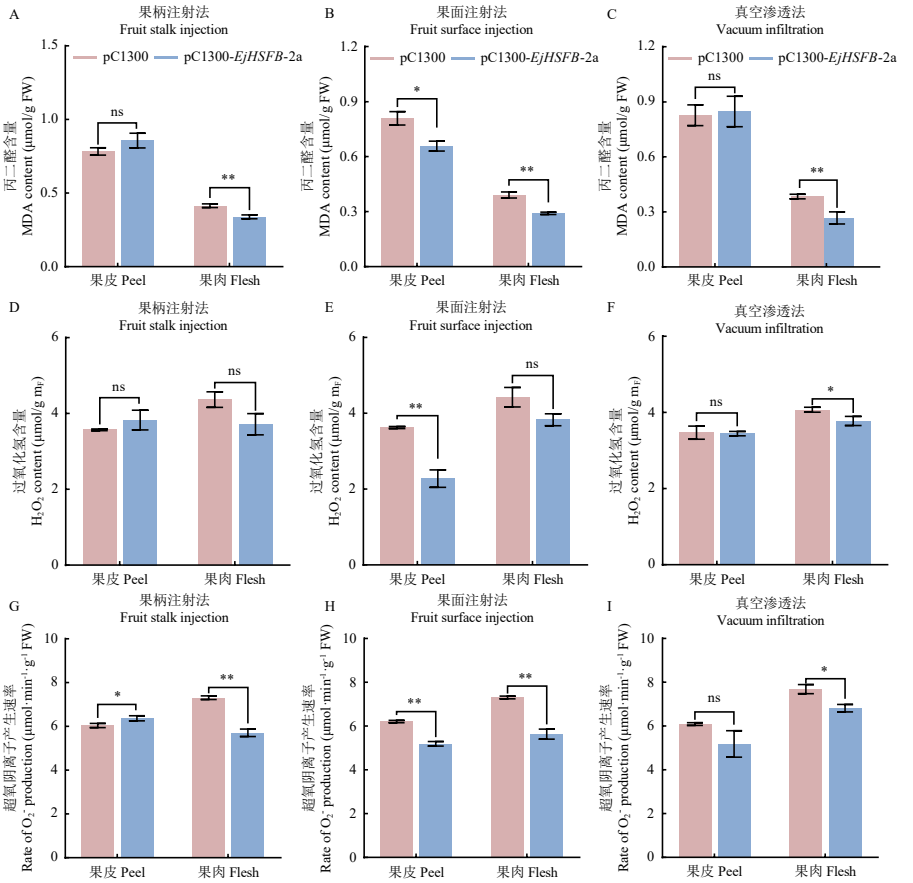


图3　不同转化方法对高温胁迫下枇杷果实细胞膜损伤程度的影响

Fig. 3　Effects of different transformation methods on cell membrane damage of loquat fruit under high temperature stress

法均能显著提高果肉组织中的SOD活性（图4-A、C）；而果面注射法则在果皮与果肉2种组织中均诱导了SOD活性的显著上升（图4-B）。3种方法在果肉组织中POD活性均表现出上调作用，其中真空渗透法提升幅度最大（较对照上升25.80%），果面注射法次之（20.28%），果柄注射法为12.73%（图4-D–F）。值得注意的是，仅果面注射法在果皮组织中显著诱导了POD活性，增幅达47.32%。CAT活性变化与SOD、POD相似（图4-G–I），果面注射法同样在果皮与果肉组织中均促进CAT活性的显著上升，增幅分别为41.95%与98.12%。与之相比，果柄注射法与真空渗透法仅显著提高了果肉组织中的CAT活性，增幅分别为26.39%和62.78%。

2.5　不同转化方法对高温胁迫下枇杷果实耐热性综合评价

本研究以3种转化方法的各项生理指标综合隶属函数值评价3种方法介导*EjHSFB-2a*过表达枇杷果实耐热性的差异。果皮中，果柄注射法、果面注射法和真空渗透法的综合隶属函数值分别为-0.211 7、0.800 0、0.243 7；果肉中，果柄注射法、果面注射法和真空渗透法的综合隶属函数值分别为0.359 2、0.674 3和0.650 7（表1）。综合隶属函数值越大，对高温胁迫的缓解能力越强。3种转化方法介导*EjHSFB-2a*过表达缓解转色期枇杷果实高温胁迫的排名为：果面注射法 > 真空渗透法 > 果柄注射法（表2）。

3　讨论

瞬时转化技术是将目的基因导入靶细胞内快速表达以分析基因功能，可在转化之后直接进行表型鉴定，主要方式有粒子轰击转化、PEG介导原生质体转化、植物病毒载体介导转化以及农杆菌介导转化，具有周期短、转化效率高、通量高等优点[28–29]。

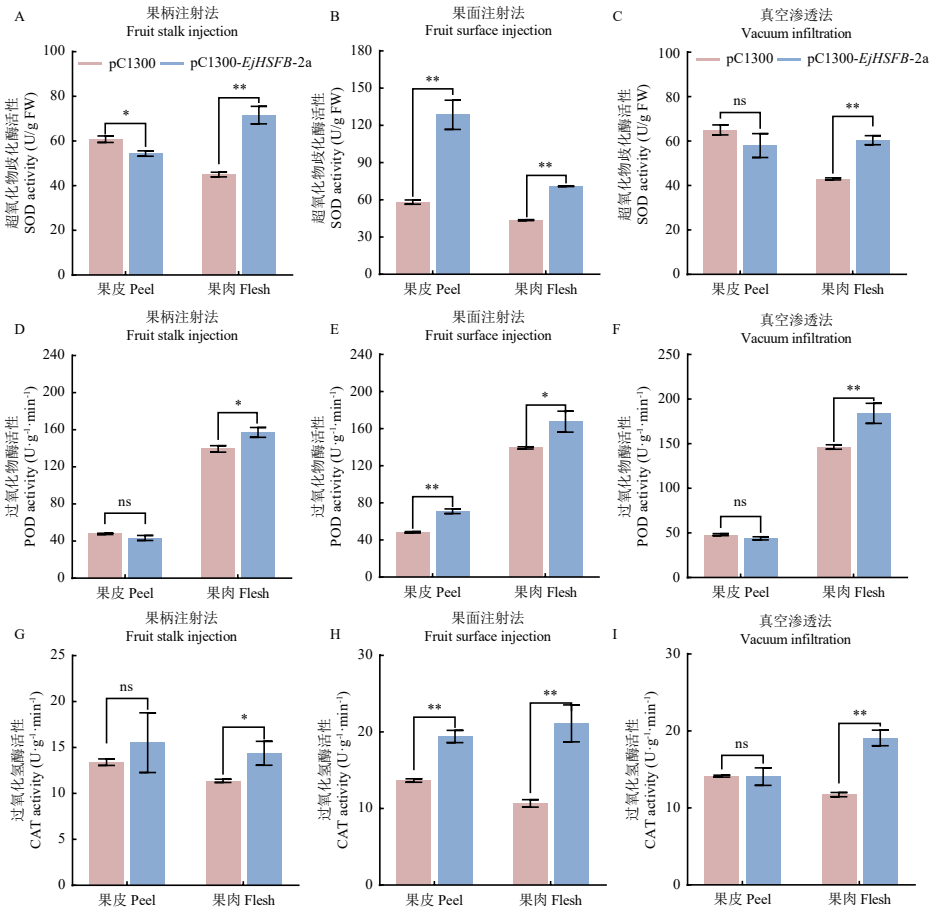


图4 不同转化方法对高温胁迫下枇杷果实抗氧化酶活性的影响

Fig. 4 Effects of different transformation methods on antioxidant enzyme activities in loquat fruit under high temperature stress

其中农杆菌介导的瞬时转化技术具有高效整合、可批量转化、操作简便、效果佳等优点。王碧莹等[30]在喜树（*Camptotheca acuminata* Decne.）中建立了一种降低叶片个体差异的瞬时转化方法，使用叶片直接注射法过表达*GUS*基因。Chen等[31]使用果面注射法在柑橘（*Citrus reticulata* Blanco）果实中过表达与沉默*CrWRKY42*，发现其在柑橘果实中正向调控叶绿素降解和类胡萝卜素的生物合成。Han等[32]使用真空侵染法在桂花（*Osmanthus fragrans*（Thunb.）Lour.）花瓣中成功过表达*OfWRKY3*。王树军等[33]将农杆菌瞬时转化荔枝（*Litchi chinensis* Sonn.）果实组织中，发现使用果柄注射法注射农杆菌后，果柄注射口部位乙烯迅速增加且促进果皮转色。本研究使用了果柄注射法、果面注射法以及真空渗透法这3种转化方法瞬时过表达*EjHSFB-2a*。果面注射法之所以能成为在果皮组织中实现有效转化的唯一方法，主要原因可能在于其将菌液直接且局限性地注入果皮组织，实现了高效的局部转化。相比之下，真空渗透法在果肉组织中诱导了高水平的基因表达，这很可能得益于真空负压驱动菌液通过按压孔从果肉组织间隙进行系统性渗透，从而实现了对果肉更均匀、高效地转化，但按压孔处更容易受到高温胁迫损伤。而果柄注射法效率相对较低，推测是其依赖果柄维管束进行长距离运输，菌液在途中可能被稀释或受阻所致。

高温胁迫会引发氧化应激，导致细胞内产生过多的活性氧物质，从而损害细胞结构和功能[4]。高温胁迫下丙二醛大量累积，其生成加速了细胞膜的破坏，致使膜透性增大，从而抑制了细胞功能，降低了植物的耐热性[34]。Zhang等[35]在苹果（*Ma-*

表1　三种转化方法生理指标平均隶属函数值

Table 1　Average membership function values of physiological indicators for the three transformation methods

测定指标 Measured parameters	隶属函数值 Membership function value					
	果皮 Peel			果肉 Flesh		
	果柄注射法 Fruit stalk injection	果面注射法 Fruit surface injection	真空渗透法 Vacuum infiltration	果柄注射法 Fruit stalk injection	果面注射法 Fruit surface injection	真空渗透法 Vacuum infiltration
转化成功率 Transformation success rate	0	1.000 0	0	0	1.000 0	1.000 0
基因表达水平 Gene expression level	0	1.000 0	0.065 4	0	0.785 7	1.000 0
热害发生率 Heat injury incidence	0.666 7	0	1	0.666 7	0	1.000 0
热害指数 Heat injury index	0.166 7	0	1	0.166 7	0	1.000 0
MDA	-3.664 2	1.000 0	0.214 3	0	0.578 7	1.000 0
H_2O_2	0	1.000 0	0.097 9	1.000 0	0.792 1	0
O_2^-	0.324 2	1.000 0	0	0.899 6	1.000 0	0
SOD	0.002 8	1.000 0	0	0.859 1	1.000 0	0
POD	0	1.000 0	0.059 6	0	0.577 7	1.000 0
CAT	0.386 3	1.000 0	0	0	1.000 0	0.507 3
平均值 Average	-0.211 7	0.800 0	0.243 7	0.359 2	0.674 3	0.650 7

表2　三种转化方法综合评价

Table 2　Comprehensive evaluation of the three transformation methods

部位 Tissue	方法 Methods	综合隶属函数值 Comprehensive membership function value	排名 Ranking
果皮 Peel	果柄注射法 Fruit stalk injection	-0.211 7	3
	果面注射法 Fruit surface injection	0.800 0	1
	真空渗透法 Vacuum infiltration	0.243 7	2
果肉 Flesh	果柄注射法 Fruit stalk injection	0.359 2	3
	果面注射法 Fruit surface injection	0.673 4	1
	真空渗透法 Vacuum infiltration	0.650 7	2

lus pumila Mill.）植株中瞬时过表达*MdHSFB2a*后发现苹果植株ROS积累减少，*Fv*/*Fm*值增加，植株耐热性增强。葡萄（*Vitis vinifera* L.）叶片中瞬时过表达*VvHSFB2a*降低了叶片的相对电导率，植株叶片长势更优[36]。作为植物体内清除活性氧的关键防线，SOD、POD及CAT的协同作用对维持细胞氧化还原稳态至关重要[37]。在本研究中，*EjHSFB-2a*的过表达有效缓解了枇杷果实由高温引起的氧化损伤，并提高了果实的抗氧化酶活性，结果表明，3种方法的转化效率与组织特异性存在显著差异，转化效率由高到低综合表现为果面注射法＞真空渗透法＞果柄注射法。在已报道的研究中，多采用单一方法，缺乏对同一体系中不同方法效率的比较，而本研究首次在枇杷果实中对3种瞬时转化方法进行了平行比较，结合基因表达水平及生理指标进行综合评价，使对不同转化方法优劣的判断更为全面客观。本研究也存在一定的局限性，仅使用了单个基因进行转化效率的评估，未来可增加多个不同特性的基因进行交叉验证，同时本研究以高温胁迫为评价体系，所得结论是否适用于其他逆境（如低温、干旱）或果实发育阶段，尚需进一步验证。

因此，在后续研究中，若目标为系统研究果皮与果肉组织的整体抗氧化响应，果面注射法为较理想的选择。并且可通过优化处理方法进一步提升转化效率并降低对果实的物理损伤。同时可将本研究的比较方案拓展至其他木本果树，检验3种方法在不同物种间的适用性差异，为建立广谱性的果实瞬时转化技术体系提供理论基础。

4 结论

果柄注射法、果面注射法及真空渗透法3种转化方法均能通过上调*EjHSFB-2a*的表达，有效减轻高温胁迫下枇杷果实的细胞膜损伤，并激活抗氧化酶系统，从而增强果实的耐热性。综合比较转化效率及其对生理表型的改善效果发现，果面注射法是枇杷果实果皮与果肉中基因瞬时遗传转化功能鉴定的最适方法。

文章所有附表数据请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260506150355_NewsFile_85.pdf）。

参考文献

[1] 林顺权. 枇杷属野生种种质资源的研究与创新利用进展 [J]. 园艺学报, 2017, 44(9): 1704-1716.
Lin SQ. A review on research of the wild species in genus *Eriobotrya* germplasm and their innovative utilization [J]. Acta Hortic Sin, 2017, 44(9): 1704-1716.

[2] 刘羿飞, 陈奇凌, 吴翠云. 外源亚精胺对枣树抗高温胁迫的调节机制 [J]. 北方园艺, 2024(4): 14-20.
Liu YF, Chen QL, Wu CY. Regulation mechanism of exogenous spermidine on resistance of jujube tree to high temperature stress [J]. North Hortic, 2024(4): 14-20.

[3] 桑荣生, 吴宝玉. 枇杷果实日灼等非侵染性病害调查与分析 [J]. 农业科技通讯, 2020(2): 173-177.
Sang RS, Wu BY. Investigation and analysis of non-infectious diseases such as sunburn in loquat fruits [J]. Bull Agric Sci Technol, 2020(2): 173-177.

[4] Huang FY, Lei Y, Duan JH, et al. Investigation of heat stress responses and adaptation mechanisms by integrative metabolome and transcriptome analysis in tea plants (*Camellia sinensis*) [J]. Sci Rep, 2024, 14: 10023.

[5] 邓朝军, 许奇志, 蒋际谋, 等. 高温胁迫对枇杷果皮热伤害的抗氧化特性影响 [J]. 热带亚热带植物学报, 2012, 20(5): 439-444.
Deng CJ, Xu QZ, Jiang JM, et al. Changes in antioxidant properties induced by heat injury in loquat peel under high temperature stress [J]. J Trop Subtrop Bot, 2012, 20(5): 439-444.

[6] 高雨薇, 邓朝军, 许奇志, 等. 外源褪黑素对新白8号枇杷果实日灼和果皮解剖结构的影响 [J]. 果树学报, 2024, 41(7): 1387-1400.
Gao YW, Deng CJ, Xu QZ, et al. Effects of exogenous melatonin on the sunburn and peel anatomical structure of Xinbai 8 loquat fruit [J]. J Fruit Sci, 2024, 41(7): 1387-1400.

[7] 潘德灼, 邓朝军, 吕晓杰, 等. 日灼胁迫对枇杷果皮蛋白质组的影响 [J]. 西北植物学报, 2016, 36(9): 1801-1812.
Pan DZ, Deng CJ, Lü XJ, et al. Effect of sunburn stress on pericarp proteomics in loquat fruits [J]. Acta Bot Boreali Occidentalia Sin, 2016, 36(9): 1801-1812.

[8] 刘洪涛, 黄卫东, 郝燕燕. 果实对高温逆境的响应及其信号转导机理 [J]. 中国食品学报, 2004, 4(2): 95-99.
Liu HT, Huang WD, Hao YY. Response of fruit to high temperature stress and its signal transduction mechanism [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2004, 4(2): 95-99.

[9] 刘佳, 张国薇. 四川地区果树间套作大豆高温干旱灾害分析及应对措施 [J]. 四川农业科技, 2022(10): 21-23.
Liu J, Zhang GW. Analysis and countermeasures of high temperature and drought disaster of intercropping soybean among fruit trees in Sichuan area [J]. Sichuan Agric Sci Technol, 2022(10): 21-23.

[10] Guo M, Liu JH, Ma X, et al. The plant heat stress transcription factors (HSFs): structure, regulation, and function in response to abiotic stresses [J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 114.

[11] Chen YP, Deng CJ, Xu QZ, et al. Integrated analysis of the metabolome, transcriptome and miRNome reveals crucial roles of auxin and heat shock proteins in the heat stress response of loquat fruit [J]. Sci Hortic, 2022, 294: 110764.

[12] Wahid A, Gelani S, Ashraf M, et al. Heat tolerance in plants: an overview [J]. Environ Exp Bot, 2007, 61(3): 199-223.

[13] Wang L, Gao YH, Zhang L, et al. Reduced proteasome degradation of HsfB2a at higher temperatures is responsible for the inhibition of anthocyanin synthesis in pear [J]. Plant Cell, 2025, 37(6): koaf102.

[14] Li T, Xu SJ, Zhang YY, et al. Molecular mechanism analysis of LdHSFB2a in lily thermotolerance [J]. Stress Biol, 2025, 5: 45.

[15] Chi ZH, Zhao ML, Wang LW, et al. EjNAC25, a NAC transcription factor in early-maturing seedless triploid loquat, promotes sugar and malic acid accumulation by activating EjNI and EjtDT2 [J]. Postharvest Biol Technol, 2025, 224: 113474.

[16] Zhang HF, Wang YT, Du Y, et al. Sorbitol source-sink distribution and S6PDH regulation modulate freezing tolerance in young loquat (*Eriobotrya japonica*) fruits [J]. Plant Physiol Biochem, 2026, 231: 110945.

[17] 吴艳菊, 冷彦儒, 景思荦, 等. 利用真空侵染法在紫花苜蓿中瞬时表达*GUS*基因 [J]. 分子植物育种, 2022, 20(3): 859-864.
Wu YJ, Leng YR, Jing SL, et al. Expression of *GUS* gene in *Medicago sativa* L. by vacuum infiltration [J]. Mol Plant Breed, 2022, 20(3): 859-864.

[18] Fan ZY, Wang Y, Zhai YL, et al. ERF100 regulated by ERF28 and NOR controls pectate lyase 7, modulating fig (*Ficus carica* L.) fruit softening [J]. Plant Biotechnol J, 2025, 23(7): 2611-2626.

[19] Wang YS. A draft genome, resequencing, and metabolomes reveal the genetic background and molecular basis of the nutritional and medicinal properties of loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl) [J].

Hortic Res, 2021, 8: 231.

[20] Banin Sogvar O, Razavi F, Rabiei V, et al. Postharvest application of L-cysteine to prevent enzymatic browning of 'Stanley' plum fruit during cold storage [J]. J Food Process Preserv, 2020, 44(10): e14788.

[21] Wang ZT, Guo J, Luo WX, et al. Salicylic acid cooperates with lignin and sucrose signals to alleviate waxy maize leaf senescence under heat stress [J]. Plant Cell Environ, 2025, 48(6): 4341-4355.

[22] Gao Y, Dong X, Wang RJ, et al. Exogenous calcium alleviates oxidative stress caused by salt stress in peanut seedling roots by regulating the antioxidant enzyme system and flavonoid biosynthesis [J]. Antioxidants, 2024, 13(2): 233.

[23] Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP. Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiol, 1996, 110(1): 125-136.

[24] Siragusa S, Fontana C, Cappa F, et al. Disruption of the gene encoding glutamate dehydrogenase affects growth, amino acids catabolism and survival of *Lactobacillus plantarum* UC1001 [J]. Int Dairy J, 2011, 21(2): 59-68.

[25] Aghdam MS, Fard JR. Melatonin treatment attenuates postharvest decay and maintains nutritional quality of strawberry fruits (*Fragaria*×*anannasa* cv. Selva) by enhancing GABA shunt activity [J]. Food Chem, 2017, 221: 1650-1657.

[26] 张钰林, 刘亚敏, 刘玉民, 等. 不同品种香榧对高温的生理响应及其耐热性评价 [J]. 森林与环境学报, 2025, 45(2): 192-202.
Zhang YL, Liu YM, Liu YM, et al. Physiological responses and heat resistance of *Torreya grandis* varieties to high temperatures [J]. J For Environ, 2025, 45(2): 192-202.

[27] Gasic K, Hernandez A, Korban SS. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction [J]. Plant Mol Biol Rep, 2004, 22(4): 437-438.

[28] 杨丽萍. 植物瞬时表达系统的研究进展 [J]. 现代农业研究, 2019, 25(5): 51-52.
Yang LP. Research progress of plant transient expression system [J]. Mod Agric Res, 2019, 25(5): 51-52.

[29] 李玲, 顾恒, 岳远征, 等. 木本植物瞬时转化体系的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2020, 18(23): 7784-7794.
Li L, Gu H, Yue YZ, et al. Advances in transient transformation systems of woody plants [J]. Mol Plant Breed, 2020, 18(23): 7784-7794.

[30] 王碧莹, 谷金芸, 霍春红, 等. 根瘤农杆菌介导的喜树叶片瞬时转化体系的建立 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(17): 5624-5630.
Wang BY, Gu JY, Huo CH, et al. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens* mediated transient transformation system in *Camptotheca acuminata* leaves [J]. Mol Plant Breed, 2018, 16(17): 5624-5630.

[31] Chen HY, Ji HY, Huang WK, et al. Transcription factor CrWRKY42 coregulates chlorophyll degradation and carotenoid biosynthesis in citrus [J]. Plant Physiol, 2024, 195(1): 728-744.

[32] Han YJ, Wu M, Cao LY, et al. Characterization of OfWRKY3, a transcription factor that positively regulates the carotenoid cleavage dioxygenase gene *OfCCD4* in *Osmanthus fragrans* [J]. Plant Mol Biol, 2016, 91(4/5): 485-496.

[33] 王树军, 王果, 李焕苓, 等. 农杆菌注射法瞬时转化荔枝果实组织的研究 [J]. 热带作物学报, 2019, 40(12): 2405-2410.
Wang SJ, Wang G, Li HL, et al. Transformation of tissues of litchi fruit with injection of *Agrobacterium* [J]. Chin J Trop Crops, 2019, 40(12): 2405-2410.

[34] Zhou LJ, Geng ZQ, Wang YX, et al. A novel transcription factor CmMYB012 inhibits flavone and anthocyanin biosynthesis in response to high temperatures in *Chrysanthemum* [J]. Hortic Res, 2021, 8: 248.

[35] Zhang ZJ, Yang C, Xi J, et al. The MdHSC70-MdWRKY75 module mediates basal apple thermotolerance by regulating the expression of heat shock factor genes [J]. Plant Cell, 2024, 36(9): 3631-3653.

[36] Li SC, Yuan L, Yu HB, et al. The HSFA2-HSFB2a-WRKY10 transcriptional cascade mediates thermotolerance across grape germplasms [J]. Plant Physiol, 2025: kiaf651.

[37] Sun TX, Wang WL, Chan ZL. How do cool-season turfgrasses respond to high temperature: progress and challenges [J]. Grass Res, 2024, 4: e010.

（责任编辑　高洁）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):188-197

甜瓜*CmPOD*基因家族鉴定及叶组织响应低温胁迫的表达分析

梁智伦 漆思庆 李欣洋 梁健浩 刘骕骝*
（湖州学院生命健康学院，湖州 313000）

摘 要： 【目的】III类过氧化物酶（class III peroxidases, *POD*）基因家族参与植物中多种生物与非生物胁迫。为探究甜瓜*CmPOD*家族基因对低温胁迫的响应，进行基因鉴定并对叶组织进行低温表达分析。【方法】以薄皮甜瓜‘通甜蜜4号’为材料，采用生物信息学方法，鉴定甜瓜*POD*基因家族并对其理化性质、进化树、基因结构、顺式作用元件进行系统分析。对部分*CmPOD*基因进行蛋白结构预测和低温胁迫下的表达分析。【结果】通过鉴定获得77个*CmPOD*基因家族成员，命名为*CmPOD1-1*-*CmPOD12-7*，氨基酸残基数范围为121-416 aa，pI值范围为4.53-9.50；亚细胞定位主要分布在叶绿体和细胞外基质。*CmPOD*基因非均匀分布在12条染色体上，在Chr01和Chr11分布较集中，分别有15个成员；进化树分析*CmPOD*基因家族分为13个亚族；启动子区富含MYB、MYC、ABRE和LTR等胁迫响应元件；RT-qPCR结果表明，低温4 ℃处理24、48 h后，*CmPOD11-13*、*CmPOD12-6*和*CmPOD11-14*等基因在叶片中上调表达，*CmPOD7-3*在叶片中下调表达。【结论】在甜瓜中鉴定得到77个*POD*基因家族成员，在低温胁迫下表达水平不同，推测*CmPOD*基因家族参与甜瓜低温胁迫响应。

关键词： 甜瓜；*POD*基因家族；低温胁迫；表达分析；生物信息学分析
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-0940

Identification of the *CmPOD* Gene Family in Melon and Expression Analysis of Leaf Tissues under Low-temperature Stress

LIANG Zhi-lun QI Si-qing LI Xin-yang LIANG Jian-hao LIU Su-shuang*
（*Institute of Life and Health, Huzhou College, Huzhou* 313000）

Abstract: 【Objective】The class III peroxidase (*POD*) gene family is involved in various biotic and abiotic stresses in plants. This study aimed to identify the *CmPOD* family genes and analyze their expression in leaf tissues under low-temperature stress to explore their response to cold stress. 【Method】The thin-skinned melon variety ‘Tongtianmi 4’ was used as the material. Bioinformatics methods were employed to identify the melon *POD* gene family, and a systematic analysis was conducted on their physicochemical properties, phylogenetic tree, gene structure, and *cis*-acting elements. Protein structure prediction and expression analysis under low-temperature stress were performed for selected *CmPOD* genes. 【Result】A total of 77 members of the *CmPOD* gene family were identified and named *CmPOD1-1* to *CmPOD12-7*. The amino acid residue number ranged from 121 to 416 aa, and the pI value ranged from 4.53 to 9.50. Subcellular localization was mainly predicted in chloroplasts and the extracellular matrix. The *CmPOD* genes were unevenly distributed across 12 chromosomes, with 15 members each on Chr01 and Chr11. Phylogenetic analysis divided the *CmPOD* gene family into 13 subfamilies. The promoter regions were rich in stress-responsive *cis*-elements such as MYB, MYC, ABRE, and LTR. RT-qPCR results showed that after treatment at 4 ℃ for 24 h and 48 h, genes including *CmPOD11-13*, *CmPOD12-6*, and *CmPOD11-14* were upregulated in leaves, while *CmPOD7-3* was downregulated. 【Conclusion】Seventy-seven members of the *POD* gene family were identified in melon, and their expression levels varied under low-temperature stress. It is speculated that the *CmPOD* gene family is involved in the response of melon to low-temperature stress.

收稿日期：2025-09-02
基金项目：湖州学院大学生创新创业训练科研项目（2024CXCY056），浙江省“十四五”第二批本科省级教学改革项目（JGBA2024714）
*通信作者：刘骕骝 liu@zjhzu.edu.cn

Keywords: melon; *POD* gene family; low-temperature stress; expression analysis; bioinformatics analysis

甜瓜（*Cucumis melo* L.）又称香瓜，属葫芦科一年生蔓生草本园艺作物，为世界范围内的主要栽培园艺作物之一[1]，具有较高的经济价值[2-3]。该类植物果实风味独特、含糖量高，富含糖分、维生素、矿物质等多种抗氧化物质[4]。甜瓜具有生长周期较短、单位面积产量大、适宜栽培土壤类型多和适宜栽培气候类型广等特点，在我国各省市地区农业生产中发挥重要作用[5]。甜瓜原产于热带、亚热带地区，因此其耐寒性较差[6]。在实际生产过程中，为满足人们对甜瓜的需求或抵御全球变暖带来的不利影响，会选择在不适宜的时节以及高海拔或高纬度等非适宜区域开展甜瓜生产或育苗，此时易出现低温伤害问题。低温环境会直接影响甜瓜的正常生长发育，导致叶片发黄失绿、细胞膜系统稳定性丧失、光合速率下降、抗氧化能力减弱、过量自由基产生及代谢紊乱等现象，对甜瓜的生长发育、坐果率以及果实品质和产量产生显著影响[7-10]。

III类过氧化物酶（class III peroxidases, *POD*）基因家族是植物体内重要的抗氧化酶类之一[11]，参与植物抵御病原菌感染[12]、生物胁迫与非生物胁迫的过程[13]，是含金属中心的跨膜蛋白，主要可催化H_2O_2接受酚类及胺类物质的电子，将酚类物质氧化成相应产物[14]。当植物受到低温、干旱、盐碱或者病原侵染等逆境胁迫时，细胞内的活性氧含量会升高，过多的活性氧有较强的氧化性，会导致细胞内的脂质、蛋白质和DNA等生物大分子受损[15]，过氧化物酶能将过量的H_2O_2快速地转化成无害的水分子[16]，氧化酚类物质，减少细胞内活性氧含量，维持细胞内氧化还原平衡，提高植物的抗氧化能力。所以活性氧的消除是植物抵抗逆境的一个重要部分[17-18]。

目前已完成了许多对该家族成员如烟草[19]、小麦[20]和拟南芥[21]等不同作物的全基因组鉴定工作，而关于其对低温胁迫应答的调控网络构建方面鲜有报道。本研究采用生物信息学方法从甜瓜全基因组中系统挖掘与分析过氧化物酶基因家族成员，并进行甜瓜叶片低温胁迫下转录水平分析，为阐明甜瓜抗低温胁迫的分子机制以及利用该基因家族资源奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

以薄皮甜瓜（*Cucumis melo* L.）品种‘通甜蜜4号’为实验材料，种子经培养皿培养至发芽后转移至育苗钵，采用蛭石与营养土混合基质（体积比1∶5）进行育苗，播种于直径10 cm的育苗钵中，每钵播种2粒，共10钵。幼苗培养于人工气候箱[光照强度200 μmol/(m^2·s)，光周期16 h光照/8 h黑暗，温度（25±1）℃，相对湿度80%±5%]。待幼苗发育至第3片真叶完全展开时，约播种后25 d，将处理组植株转移至低温培养箱（4 ℃恒温，湿度与光周期维持一致），对照组保持原培养条件。分别于低温处理0、24、48 h时，采集植株基部第1片叶，每时间点取3片叶片样本，液氮速冻后保存于-80 ℃超低温冰箱。

1.2　方法

1.2.1　POD家族成员鉴定与理化性质分析　从葫芦科基因组数据库下载甜瓜基因组蛋白序列（版本DHL92 v4.0），以拟南芥III类过氧化物酶家族为参考序列，使用BLASTp（版本2.16.0+，参数E值≤1e-10，序列相似性≥40%）筛选候选基因。通过NCBI保守结构域数据库（CDD）验证候选基因是否包含完整POD结构域（pfam00141），最终鉴定出77个*CmPOD*家族基因，命名为*CmPOD1-1*-*CmPOD12-7*。使用TBtools[22]分析氨基酸长度、不稳定指数、脂溶指数、平均亲水指数等理化性质。通过TMHMM-2.0在线网站分析跨膜域，Expasy在线网站分析等电点和分子质量，WoLF PSORT在线工具分析亚细胞定位。

1.2.2　系统进化树构建　使用MEGA11软件对*CmPOD*基因家族、拟南芥III类过氧化物酶基因家族蛋白序列进行多序列比对，采用ClustalW算法校正序列排列。采用Neighbor-Joining法构建系统进化树，遗传距离计算基于Poisson model模型，缺失数据采用Pairwise deletion，1 000次bootstrap重复评估，设置Bootstrap重复1 000次验证节点支持率。使用SOPMA在线网站预测CmPOD蛋白的二级结构，并

统计5种二级结构的比例。

1.2.3 基因结构及顺式作用元件分析 基于甜瓜基因组GFF3注释文件（版本DHL92 v4.0），使用GSDS 2.0在线网站对基因结构进行可视化分析，使用MEME Suite在线网站（参数：motif数=10，模体宽度6–50 bp）鉴定保守基序。利用TBtools获取基因转录起始位点上游1 000 bp序列，通过PlantCARE数据库对顺式作用元件进行预测[23-24]。

1.2.4 染色体定位与共线性分析 使用TBtools分析*CmPOD*家族基因在染色体的分布情况、基因密度及甜瓜物种内同源基因对。

1.2.5 蛋白结构预测分析 根据已报道的具有响应低温胁迫功能的西葫芦c47620.Graph_c0基因（GenBank登录号：MF988285）[25]，桦树bpev01.c0115.g0033和bpev01.c0127.g0079基因[26]，睡莲*NcPOD17*、*NcPOD21*和*NcPOD25*等基因[27]筛选10个E-value值 < 1e-10的*CmPOD*家族基因进行蛋白结构预测分析。利用Expasy的SWISS-MODEL对部分*CmPOD*家族基因进行三级结构预测和可视化分析。

1.2.6 叶组织低温表达分析 采用Trizol法（Invitrogen，USA）提取叶片总RNA，使用NanoDrop 2000（Thermo Fisher Scientific，USA）检测RNA纯度（A_{260}/A_{280}≥2.0，A_{260}/A_{230}≥1.8），1%琼脂糖凝胶电泳验证RNA完整性。取1 μg总RNA进行逆转录反应，使用PrimeScript™ Reverse Transcriptase（TaKaRa，Japan）和Random Primer（100 μmol/L），反应体系为20 μL，具体包括：1.0 μL Total RNA，1.0 μL Random Primer，4.0 μL 5×M-MLV Buffer，1 μL dNTP Mixture（10 mmol/L），1 μL Reverse Transcriptase，1 μL RNase Inhibitor，并使用RNase-Free Water补至20 μL。反应条件为：42 ℃ 60 min，70 ℃ 15 min，4 ℃保存。

所有RT-qPCR引物序列详见附表1。RT-qPCR采用SYBR Green Pro Taq HS预混试剂（Accurate Biology，China），反应体系为10 μL，具体包括：1.0 μL cDNA模板，5.0 μL 2×SYBR Green Premix，正反向引物各0.4 μL（10 μmol/L），0.2 μL ROX参比染料，并使用ddH_2O补至10 μL。反应程序：95 ℃预变性1 min；40个循环（95 ℃ 10 s，60 ℃ 60 s）；熔解曲线分析（60–95 ℃，升温速率0.2 ℃/s）。以*EF1α*为内参基因，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算相对表达量，显著性差异标准为Fold Change≥2.0（上调）或≤0.5（下调）。

2 结果

2.1 *CmPOD*基因家族成员鉴定与理化性质分析

本研究共鉴定到77个*CmPOD*基因，理化性质见附表2。根据染色体定位情况，按顺序命名为*CmPOD1-1*–*CmPOD12-7*。77个基因的氨基酸长度为121 aa（*CmPOD1-12*）–416 aa（*CmPOD3-5*），长度相差约295 aa；分子质量为13.3 kD（*CmPOD1-12*）–45.0 kD（*CmPOD3-5*），与长度变化趋势一致；pI介于4.53（*CmPOD9-2*）–9.50（*CmPOD11-12*），涵盖酸性和碱性蛋白，推测该家族成员蛋白可能在不同的细胞微环境中发挥作用；不稳定性指数介于26.05（*CmPOD2-4*）–55.49（*CmPOD3-5*）；亲水性GRAVY值为-0.499（*CmPOD1-13*）–0.324（*CmPOD2-3*），共有68个基因呈负值，其余的为正值，因此整体上呈亲水性；脂溶指数为73.05（*CmPOD3-5*）–114.71（*CmPOD2-3*），其中疏水性成员有9个。家族成员中有33个含有跨膜结构域，另外44个不含跨膜结构域。亚细胞定位为叶绿体32个、细胞外18个、细胞质9个、液泡膜9个、内质网3个、质膜3个、线粒体2个、细胞核1个。叶绿体和细胞外定位频率较高；推测*CmPOD*家族结构多样、稳定性不同及亚细胞定位存在差异性，上述差异化现象或为*CmPOD*成员因抗逆境而发生功能分化的结果。

2.2 系统进化树构建

为研究*CmPOD*基因的进化关系，利用77个甜瓜和73个拟南芥的POD蛋白序列构建了进化树，将其分为13个亚族（图1），V族仅含拟南芥POD，XIII族仅含甜瓜POD。该进化树由大量同源基因构成的小单系群组成，其中*CmPOD4-4*和*CmPOD8-5*为同源序列，与*AT2G37130.1*等聚为一类（XI族）。*CmPOD2-4*和*CmPOD12-7*、*CmPOD4-3*和*CmPOD9-1*为同源序列，与*AT3G28200.1*、*AT5G40150.1*、*AT4G17690.1*和*AT5G47000.1*等聚为一类（VIII族）。*CmPOD1-6*和*CmPOD11-3*为同源序列，与*AT4G11290.1*等聚为一类（IV族）。

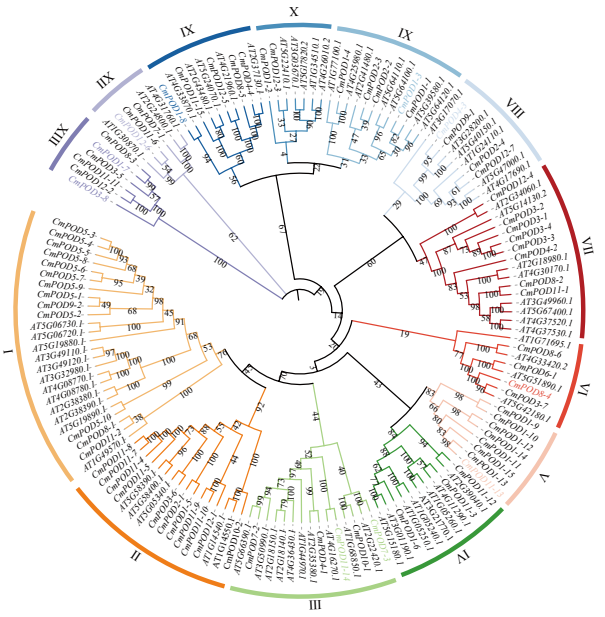
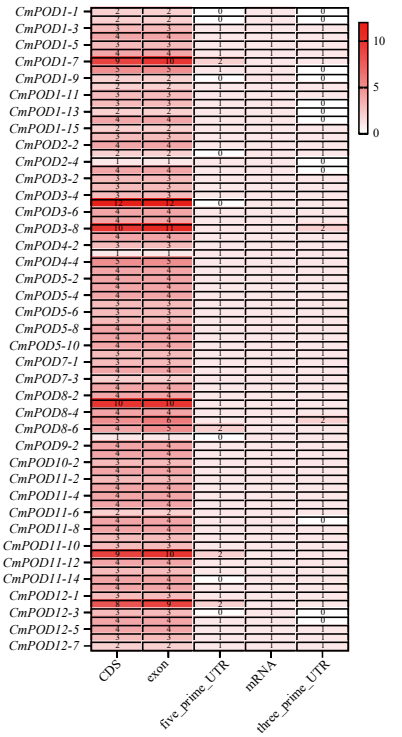


图1　*CmPOD*家族系统进化树构建

Fig. 1　Construction of the phylogenetic tree of the *CmPOD* family



CDS：编码序列；exon：外显子；five prime UTR：5′非翻译区；mRNA：信使RNA；three prime UTR：3′非翻译区

CDS: Coding sequence; exon: exon; five prime UTR: 5′ untranslated region; mRNA: messenger RNA; three prime UTR: 3′ untranslated region

图2　*CmPOD*家族基因结构数量分析

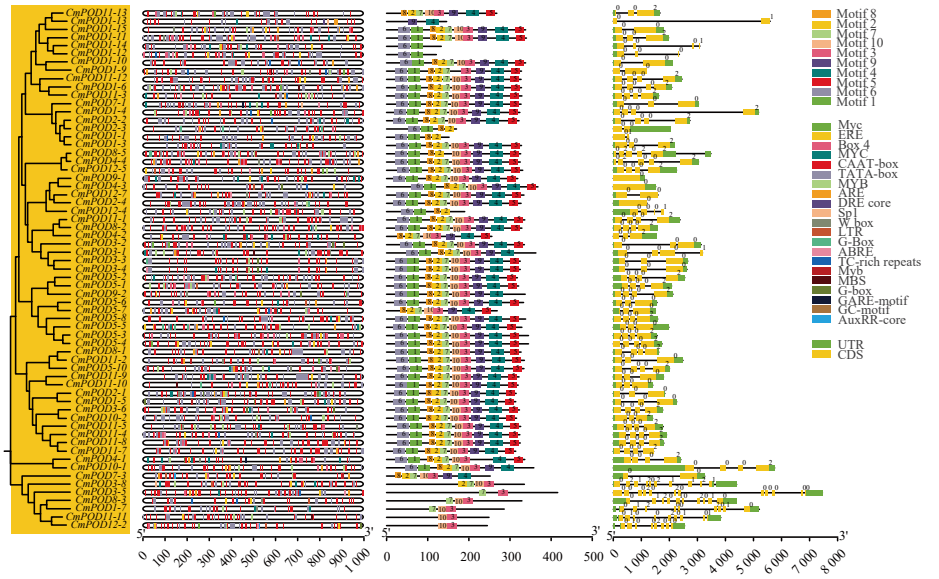
Fig. 2　Quantitative analysis of gene structure in the *CmPOD* family

2.3　*CmPOD*基因结构及顺式作用元件分析

*CmPOD*基因家族CDS结构含1–12个（图2、图3）。5′ UTR结构含1–2个，存在于69个基因中，缺失于8个基因中。3′ UTR结构含1–2个，存在于65个基因中，缺失于12个基因中。所有基因均为单转录本。基因长度：544 bp（*CmPOD1-1*）–7 457 bp（*CmPOD3-5*）。外显子长度：26 bp（*CmPOD12-3*）–2 878 bp（*CmPOD10-1*）。218个内含子相位0占比74.1%，符合真核生物完整密码子边界偏好。20个相位1占比6.8%，56个相位2占比19.0%。相位1、相位2分布均匀，无显著进化偏向。综合分析，多数基因外显子数等于CDS数，表明UTR未嵌入外显子。特殊地，重叠基因如*CmPOD11-7*、*CmPOD11-8*共享CDS区，这种序列结构提示可能存在可变剪接机制。

*CmPOD*基因家族每个成员包含的motif数量3–10个不等，而每个motif的出现频率也差异显著（图3、图4）。其中，motif 3最为保守，存在于71个成员中。这个motif序列“GLSVTDMVALSGAHTIGMARCEN”长度适中，约20–25个氨基酸，offset值分布广（110–207）。其余motif出现于58–67个基因，在offset值106–142常见。*CmPOD1-1*、*CmPOD1-2*、*CmPOD1-7*、*CmPOD1-12*、*CmPOD1-13*、*CmPOD1-14*、*CmPOD2-3*、*CmPOD3-5*、*CmPOD3-8*、*CmPOD8-3*、*CmPOD11-11*、*CmPOD12-2*和*CmPOD12-4*的motif缺失较多（6–8个）。这些基因可能具有特化功能或表达于特定环境。*CmPOD*家族motif与基因的关系显示高度保守与特化并存。

由表1和图5可知，在元件数量上，基础转录>胁迫响应>光调控>激素信号>防御反应。所有的基因都存在TATA-box和CAAT-box元件。都含有2–4种胁迫响应元件，其中MYC存在于65个基因中，MYB存在于58个基因中，ARE存在于50个基因中，ABRE存在于27个基因中，LTR存在于14个基因中，DRE-core存在于3个基因中。*CmPOD*家族转录起始位点前1 000 bp的结构是由基础转录元件TATA-box、CAAT-box以及多种类型的调控元件构成。



数字0、1、2表示内含子相位

0, 1, and 2 indicate intron phases

图3 *CmPOD*家族基因结构及调控元件分析

Fig. 3 Analysis of the gene structure and regulatory elements in the *CmPOD* family

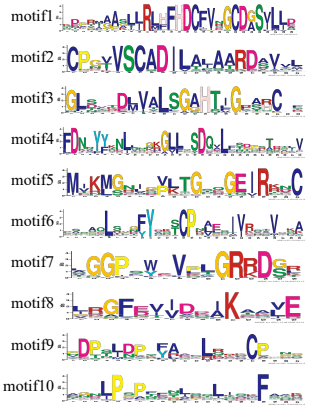


图4 *CmPOD*家族motif组成分析

Fig. 4 Motif composition of the *CmPOD* family

2.4 染色体定位与共线性分析

*CmPOD*基因在12条染色体上表现出不均匀分布，其中数量最多的为Chr01和Chr11，分别为15个基因，占比41.1%，数量最少的为Chr06、Chr09、Chr10，只各有1个、2个和2个基因；其余分布在Chr02-Chr05、Chr07-Chr08、Chr12上的染色体，则有3-10个*CmPOD*基因（图6）。由此推断Chr01和Chr11是*CmPOD*家族的核心分布区。

表1 *CmPOD*家族顺式作用元件功能

Table 1 *Cis*-acting element functions in the *CmPOD* family

顺式作用元件 *Cis*-acting element	功能 Function
ABRE	脱落酸响应元件，参与ABA信号通路和胁迫响应
DRE core	脱水响应元件，响应低温与干旱
MYB	转录因子结合位点，参与发育、代谢和胁迫响应
MYC	转录因子结合位点，参与JA信号通路和胁迫响应
ARE	抗氧化响应元件，参与活性氧清除和氧化胁迫防御
LTR	低温响应元件，参与冷胁迫基因调控
ERE	乙烯响应元件，调控果实成熟和胁迫响应
GARE-motif	赤霉素响应元件，介导GA信号通路
AuxRR-core	生长素响应元件，调控生长素依赖基因表达
Box	光响应元件，调控光诱导基因表达
Box 4	光响应元件，参与光调控基因表达
Sp1	通用转录因子结合位点，增强基础转录
W box	WRKY转录因子结合位点，调控病原菌防御反应和SA信号通路
TC-rich repeats	防御和胁迫响应元件，参与病原体应答及机械损伤响应
MBS	MYB结合位点，参与干旱诱导基因表达
TATA-box	核心启动子元件，介导RNA聚合酶II的转录起始定位
CAAT-box	增强子元件，提高基础转录效率
GC-motif	增强子元件，参与光诱导和胁迫响应

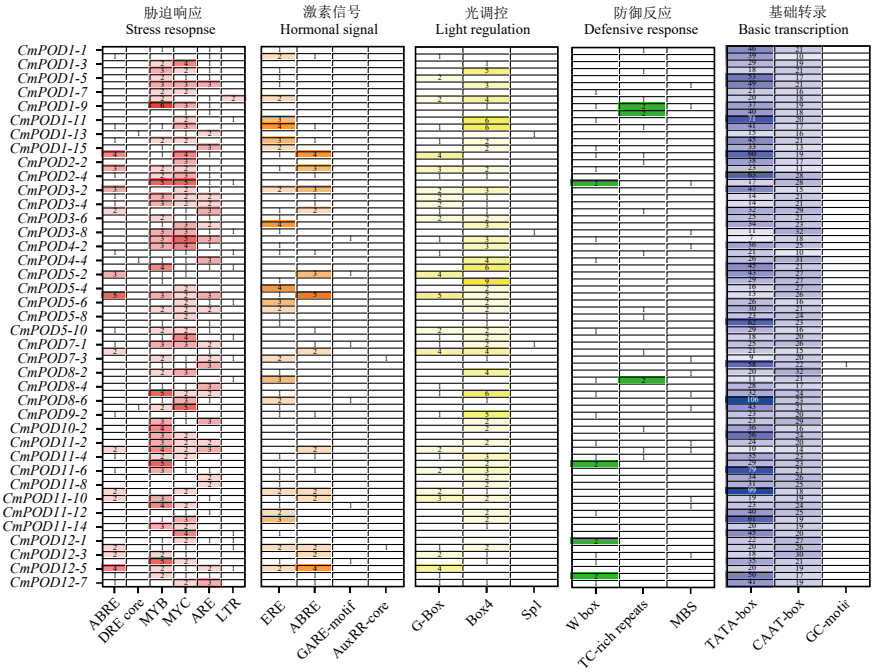


图5　*CmPOD*家族顺式作用元件统计

Fig. 5　*Cis*-acting element statistics in the *CmPOD* family

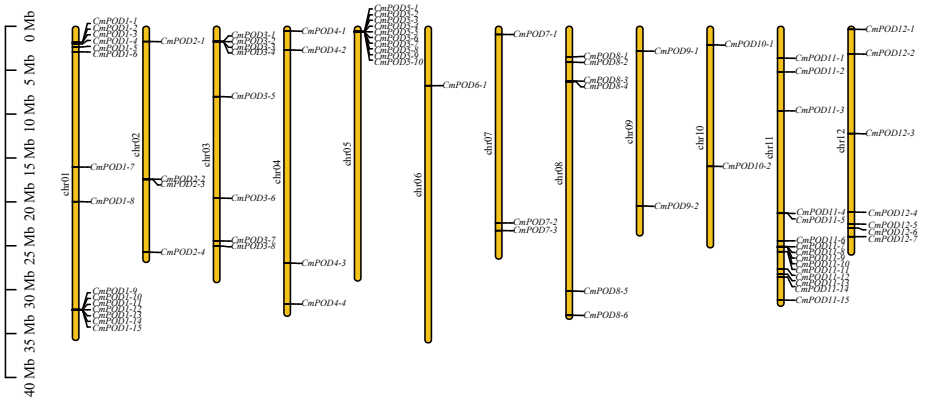


图6　*CmPOD*家族在染色体上的定位

Fig. 6　Chromosomal localization of the *CmPOD* family

*CmPOD*家族共有7个同源基因对，全部为高基因密度区；在每一基因对上，存在至少1个基因被标记为高基因密度区域；Chr04上的基因出现了最多次，共出现了4次，在4对同源基因中都出现，所以Chr04可能是同源关系热点；同时，*CmPOD2-4*、*CmPOD4-3*和*CmPOD12-7*都有多个同源伙伴，例如*CmPOD4-3*还与*CmPOD9-1*以及*CmPOD12-7*为同源（图7）。

2.5　蛋白结构预测分析

部分CmPOD蛋白结构预测结果显示（附表3，附图1），α-螺旋占整个蛋白序列长度的32.84%–43.36%。β-折叠结构占比为0%。延伸链占比为8.96%–17.91%。β-转角结构占比为0%，无规则卷曲占比最大，分别为45.43%、50.79%。推测在这类蛋

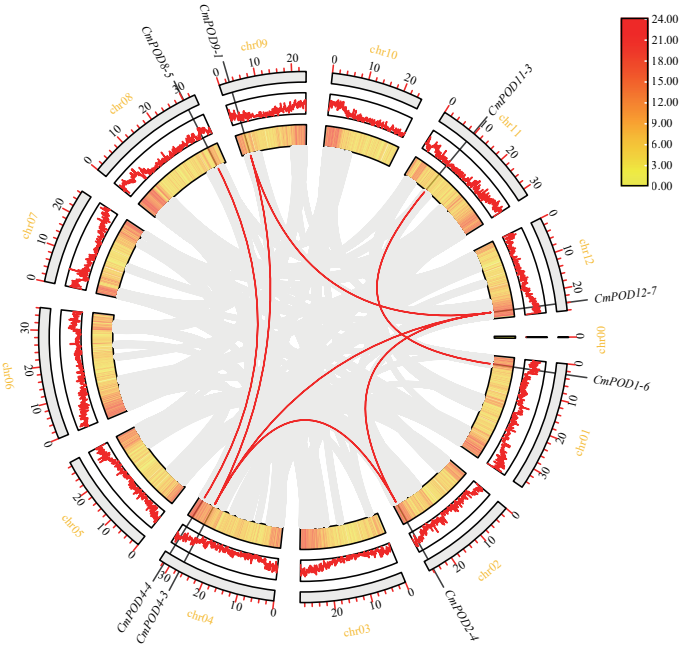


图7 *CmPOD*家族物种内共线性分析

Fig. 7 Intraspecific collinearity analysis of the *CmPOD* family

白中，结构的方向转变主要是通过较长的、柔性的、属于无规则卷曲范畴的环区来实现的，而不是紧致的β-转角。蛋白结构较柔性，有很多非刚性的结构区。

2.6 叶组织低温表达分析

利用RT-qPCR方法检测低温胁迫处理24 h、48 h后上述部分*CmPOD*基因的相对表达量变化（图8），采用*t*检验对处理后的差异进行检验（图9），并计算相对表达量倍数变化。结果表明，*CmPOD11-13*、*CmPOD12-6*、*CmPOD11-14*、*CmPOD1-8*及*CmPOD7-3*响应较强。其中*CmPOD11-13*的上调最显著，在处理24 h和48 h时上调幅度分别达到1 734倍和619倍左右；*CmPOD12-6*、*CmPOD11-14*随时间递增上调的趋势明显，48 h时均有65倍以上的变化；*CmPOD1-8*在48 h时上调至131.6倍；*CmPOD7-3*的表达在低温条件下显著下调（$P<0.05$），下调幅度在24 h和48 h时均小于1倍。除此之外，在48 h时*CmPOD1-3*和*CmPOD8-4*表现出了显著上调，但在24 h时未作出响应，故推测存在响应时间上的延迟；同时在24 h内没有被诱导表达的*CmPOD3-8*、*CmPOD1-7*，可认为其不是低温胁迫响应的主要响应基因。综上所述，通过差异表达分析得到5个低温胁迫响应基因*CmPOD11-13*、*CmPOD12-6*、*CmPOD11-14*、*CmPOD1-8*和*CmPOD7-3*。

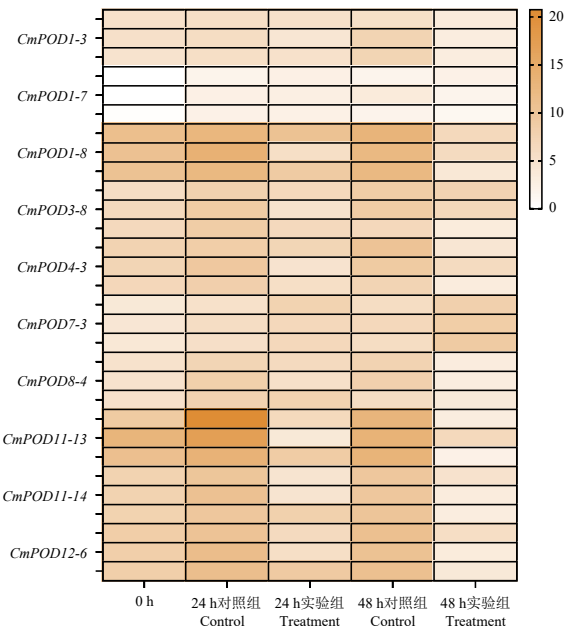
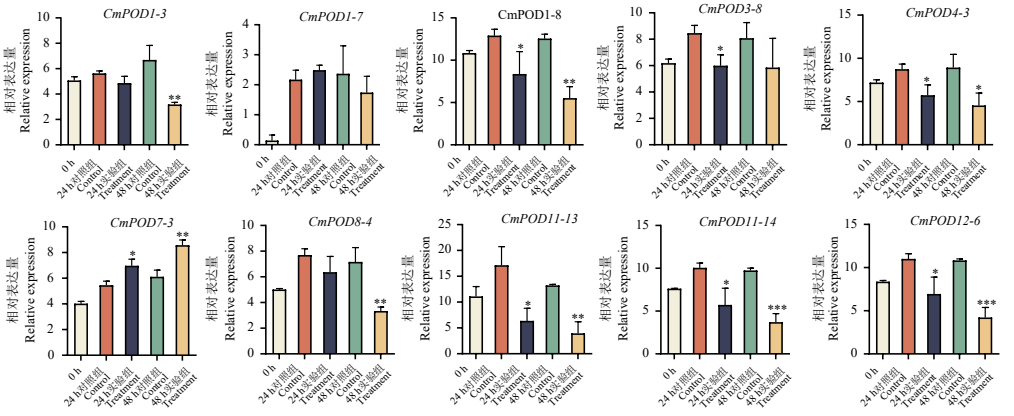


图8 *CmPOD*家族叶组织表达热图

Fig. 8 Heatmap of *CmPOD* family leaf expression



* P<0.05，** P<0.01，*** P<0.001. t-test，n=3

图9　部分*CmPOD*家族成员叶组织表达差异

Fig. 9　Expression differences of selected *CmPOD* family members in leaves

3　讨论

本研究首次在甜瓜中完成全基因组范围内*CmPOD*基因家族成员鉴定并获得77个成员，对*CmPOD*家族基因进行理化性质、系统进化、基因结构和顺式作用元件分析，通过已报道的低温响应基因筛选出部分*CmPOD*基因，进行蛋白结构预测和叶组织低温胁迫下的表达分析。研究结果显示，*CmPOD*基因在染色体上分布极不均匀。其中，Chr01和Chr11是*POD*基因富集区域，各有15个成员。*CmPOD*家族氨基酸长度变化近4倍，亚细胞定位广泛分布于8个位置。这种广泛分布暗示了其多功能性和重要性。共线性分析发现*CmPOD4-4*和*CmPOD8-5*，*CmPOD4-3*和*CmPOD9-1*，*CmPOD4-3*和*CmPOD2-4*，*CmPOD4-3*和*CmPOD12-7*，*CmPOD2-4*和*CmPOD12-7*，*CmPOD1-6*和*CmPOD11-3*，*CmPOD12-7*和*CmPOD9-1*共7对同源基因对。蛋白结构预测分析显示，部分CmPOD成员蛋白的二级结构中无规则卷曲约占50%，α-螺旋约占30%，且完全缺失β-折叠和β-转角。该类蛋白可能具有较高的结构柔性和动态性，这使其能参与更多互作过程或作为信号传导的分子，以特定构象感知或应答低温胁迫。启动子分析发现，77个*CmPOD*家族基因含有3−10个motif，普遍含有LTR、MYB、ABRE和ARE等非生物胁迫响应相关顺式作用元件，表明*CmPOD*家族基因参与冷胁迫、干旱胁迫、氧化应激等逆境应答；不同基因启动子区元件的组合不同也体现了功能上的调控差异性与特异性。差异表达分析发现，4个低温胁迫响应基因*CmPOD11-13*、*CmPOD12-6*、*CmPOD11-14*、*CmPOD1-8*在24 h或48 h处理后表达量迅速升高，推测该类基因具有清除低温造成的活性氧损伤和维持膜系统完整性的功能；特别地，*CmPOD11-13*在48 h就有极其显著的上调，说明其很可能是甜瓜低温胁迫响应的关键基因。*CmPOD7-3*的表达在24 h、48 h均受低温抑制，说明*CmPOD7-3*可能负向调控抗性或参与其他通路[24]。

本文的结果与其他作物*POD*家族基因在低温胁迫下的表达特性是一致的。如杨广东等[28]发现抗冷力较强的青椒品种在被低温处理时，其POD活性大幅度增加；Zhang等[29]在紫檀中发现一些*MsPODs*在不同时间表现出不同的表达模式；刘荣梅等[30]通过转录烟草结果发现在低温（4 ℃、15 ℃）胁迫条件下，POD含量会上升；高山等[31]发现苦瓜过氧化物酶相关基因*McAPX2*和*McPrx*在低温下显著诱导表达。由此表明，*POD*基因家族是植物抗寒不可或缺的重要组分。后续将围绕已鉴定基因进行功能验证，调控网络解析及育种应用。

4　结论

在甜瓜基因组中鉴定出77个*CmPOD*基因，并分为13个亚族。基因结构、保守基序与顺式作用元件分析显示，其功能具有保守性与协同调控特性。低温胁迫下，*CmPOD11-13*、*CmPOD12-6*和*CmPOD11-14*等基因在叶片中显著上调表达，推测它们通过增强

活性氧清除能力正向调控甜瓜的低温胁迫响应；而 *CmPOD7-3* 表达量显著下调，可能参与负向调控网络。

文章所有附表数据请到本刊官网下载（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260427093134_NewsFile_33.pdf）。

参考文献

[1] 林德佩. 中国栽培甜瓜植物的起源、分类及进化 [J]. 中国瓜菜, 2010, 23(4): 34-36.
Lin DP. Origin classification and evolution for cultivated plants of Chinese melon [J]. China Cucurbits Veg, 2010, 23(4): 34-36.

[2] 王琛, 吴敬学, 杨艳涛. 世界甜瓜生产贸易分析及对中国的启示 [J]. 中国食物与营养, 2016, 22(2): 18-22.
Wang C, Wu JX, Yang YT. Production and trade of world muskmelon and its enlightenment to China [J]. Food Nutr China, 2016, 22(2): 18-22.

[3] 谢奇君, 夏咏. 中国农产品出口贸易潜力研究——以甜瓜为例 [J]. 北方经贸, 2024(12): 38-42.
Xie QJ, Xia Y. Potential of China's cantaloupe export trade [J]. North Econ Trade, 2024(12): 38-42.

[4] 闫巧俐, 张雁鸣, 陶永霞, 等. 甜瓜营养品质分析及其代表性指标探究 [J]. 食品与机械, 2019, 35(9): 15-19, 25.
Yan QL, Zhang YM, Tao YX, et al. Nutritional quality analysis and representative indexes of melon [J]. Food Mach, 2019, 35(9): 15-19, 25.

[5] 王志丹. 中国甜瓜产业经济发展研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.
Wang ZD. Study on the development of muskmelon industry economy in China [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014.

[6] 姚雪. 甜瓜种质资源耐冷性的鉴定评价及其关联分析研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.
Yao X. Studies on identification and evaluation of chilling-tolerance and association analysis in melon germplasm [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2016.

[7] 王兴虎. 低温对厚皮甜瓜幼苗生长及生理生化特性的影响 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2005.
Wang XH. Effects of low temperature on seedling growth and physiological & biochemical properties of muskmelon (*Cucumis melo* L.) seedlings [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2005.

[8] 郝敬虹, 李天来, 孟思达, 等. 夜间低温对薄皮甜瓜果实糖积累及代谢相关酶活性的影响 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(10): 3592-3599.
Hao JH, Li TL, Meng SD, et al. Effects of night low temperature on sugar accumulation and sugar-metabolizing enzyme activities in melon fruit [J]. Sci Agric Sin, 2009, 42(10): 3592-3599.

[9] 吕星光, 周梦迪, 李敏. 低温胁迫对甜瓜嫁接苗和自根苗生长及生理特性的影响 [J]. 中国蔬菜, 2016(5): 53-57.
Lyu XG, Zhou MD, Li M. Effects of low temperature stress on growth and physiological characteristics of grafted and own root melon seedlings [J]. China Veg, 2016(5): 53-57.

[10] 和红云. 低温胁迫对甜瓜幼苗生长及生理生化的影响 [D]. 石河子: 石河子大学, 2008.
He HY. Effects of low temperature injure on seedling growth and physiological & biochemical of muskmelon (*Cucumis melo* L.) [D]. Shihezi: Shihezi University, 2008.

[11] Almagro L, Gómez Ros LV, Belchi-Navarro S, et al. Class III peroxidases in plant defence reactions [J]. J Exp Bot, 2009, 60(2): 377-390.

[12] Kidwai M, Ahmad IZ, Chakrabarty D. Class III peroxidase: an indispensable enzyme for biotic/abiotic stress tolerance and a potent candidate for crop improvement [J]. Plant Cell Rep, 2020, 39(11): 1381-1393.

[13] 牛红军, 岳鹃, 滕文华, 等. 过氧化物酶和PeroxiBase过氧化物酶数据库 [J]. 生命科学研究, 2012, 16(6): 539-544.
Niu HJ, Yue K, Teng WH, et al. Peroxidases and the database of peroxidases: PeroxiBase [J]. Life Sci Res, 2012, 16(6): 539-544.

[14] 田国忠, 李怀方, 裘维蕃. 植物过氧化物酶研究进展 [J]. 武汉植物学研究, 2001, 19(4): 332-344.
Tian GZ, Li HF, Qiu WF. Advances on research of plant peroxidases [J]. J Wuhan Bot Res, 2001, 19(4): 332-344.

[15] Lee TT. Role of phenolic inhibitors in peroxidase-mediated degradation of indole-3-acetic acid [J]. Plant Physiol, 1977, 59(3): 372-375.

[16] 杜秀敏, 殷文璇, 赵彦修, 等. 植物中活性氧的产生及清除机制 [J]. 生物工程学报, 2001, 17(2): 121-125.
Du XM, Yin WX, Zhao YX, et al. The production and scavenging of reactive oxygen species in plants [J]. Chin J Biotechnol, 2001, 17(2): 121-125.

[17] 梁艳荣, 胡晓红, 张颖力, 等. 植物过氧化物酶生理功能研究进展 [J]. 内蒙古农业大学学报: 自然科学版, 2003, 24(2): 110-113.
Liang YR, Hu XH, Zhang YL, et al. Prdgress on physiological function research of plant peroxidase [J]. J Inn Mong Agric Univ Nat Sci Ed, 2003, 24(2): 110-113.

[18] Shigeto J, Tsutsumi Y. Diverse functions and reactions of class III peroxidases [J]. New Phytol, 2016, 209(4): 1395-1402.

[19] Cheng LT, Ma LX, Meng LJ, et al. Genome-wide identification and analysis of the class III peroxidase gene family in tobacco (*Nicotiana tabacum*) [J]. Front Genet, 2022, 13: 916867.

[20] Yan J, Su PS, Li W, et al. Genome-wide and evolutionary analysis of the class III peroxidase gene family in wheat and *Aegilops tauschii* reveals that some members are involved in stress responses [J]. BMC Genom, 2019, 20: 666.

[21] Tognolli M, Penel C, Greppin H, et al. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Gene, 2002, 288(1/2): 129-138.

[22] Chen CJ, Wu Y, Li JW, et al. TBtools-II: a "one for all, all for one" bioinformatics platform for biological big-data mining [J]. Mol Plant, 2023, 16(11): 1733-1742.

[23] 郭安源, 朱其慧, 陈新, 等. GSDS: 基因结构显示系统 [J]. 遗传, 2007, 29(8): 1023-1026.
Guo AY, Zhu QH, Chen X, et al. GSDS a gene structure display server [J]. Hereditas, 2007, 29(8): 1023-1026.

[24] Hu B, Jin JP, Guo AY, et al. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server [J]. Bioinformatics, 2015, 31(8): 1296-1297.

[25] 黄丽芳, 刘建汀, 王彬, 等. 西葫芦过氧化物酶*POD1*基因的分离及表达分析 [J]. 福建农业学报, 2018, 33(9): 943-949.
Huang LF, Liu JT, Wang B, et al. Isolation and expression of peroxidase *POD1* gene from *Cucurbita pepo* [J]. Fujian J Agric Sci, 2018, 33(9): 943-949.

[26] Cai KW, Liu HX, Chen S, et al. Genome-wide identification and analysis of class III peroxidases in *Betula pendula* [J]. BMC Genom, 2021, 22: 314.

[27] Khan WU, Khan LU, Khan NM, et al. Comprehensive identification, characterization and expression analyses of the class III POD gene family in water lily (*Nymphaea colorata*) [J]. Front Plant Sci, 2025, 15: 1524657.

[28] 杨广东, 郭瑜敏. 低温胁迫对青椒苗期和花期脱落酸含量的影响 [J]. 山西农业科学, 1998, 26(2): 45-48.
Yang GD, Guo YM. Effect of low temperature stress on ABA contents of sweet pepper during seedling and florescence [J]. J Shanxi Agric Sci, 1998, 26(2): 45-48.

[29] Zhang YQ, Liu H, Ma XY, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the class III peroxidase gene (*PRXIII*) family in *Medicago sativa* L. and its function in the abiotic stress response [J]. BMC Plant Biol, 2025, 25: 443.

[30] 刘荣梅, 李凤兰, 徐永清, 等. 低温胁迫对转基因烟草生理生化的影响 [J]. 湖北农业科学, 2010, 49(11): 2819-2821.
Liu RM, Li FL, Xu YQ, et al. Effects of low temperature stress on physiological and biochemical changes of the transgenic tobacco [J]. Hubei Agric Sci, 2010, 49(11): 2819-2821.

[31] 高山, 许端祥, 陈中钐, 等. 苦瓜*McAPX2*基因及其启动子的克隆与表达分析 [J]. 热带作物学报, 2016, 37(12): 2384-2391.
Gao S, Xu DX, Chen ZS, et al. Cloning and expression analysis of the *McAPX2* gene and its promotor in *Momordica charantia* L [J]. Chin J Trop Crops, 2016, 37(12): 2384-2391.

（责任编辑　李楠）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):198-206

*CmoNST1*基因C端截短导致南瓜裸仁表型

申琼* 刘亚楠 孟洪玉
（山西农业大学园艺学院，太原 030031）

摘 要： 【目的】探究南瓜裸仁性状形成的分子基础，通过比较野生型与突变体中*NST1*等位基因（*CmoNST1*与*Cmonst1*）的序列、表达及蛋白定位差异，解析其功能差异，为南瓜分子育种提供理论依据。【方法】以有种皮自交系HS-A和裸仁自交系HLS-B为材料，克隆*CmoNST1*与*Cmonst1*基因，通过序列比对分析其变异特征，结合生物信息学方法预测蛋白结构与亚细胞定位，并利用RT-qPCR技术比较二者在各组织的表达模式。基于同源关系利用CRISPR/Cas9双靶点系统敲除黄瓜直系同源基因CsaV3_6G008900，经农杆菌转化、PCR鉴定获得阳性突变体。进一步利用显微CT三维成像比较种皮细胞结构，并测定种皮木质素、纤维素和半纤维素的含量，综合评价基因功能。【结果】野生型*CmoNST1*（1 185 bp）及其突变等位基因*Cmonst1*（1 072 bp）被成功克隆，二者分别编码394与112个氨基酸。两者均含有典型的NAM保守结构域，无跨膜结构域与信号肽，二级结构主要由无规则卷曲和α-螺旋构成。CmoNST1为不稳定酸性蛋白，而Cmonst1为稳定碱性蛋白。亚细胞定位显示，CmoNST1主要定位于细胞核，Cmonst1分布于细胞核与细胞质。表达分析表明，二者在种皮中表达量显著高于其他组织。系统进化分析表明，CmoNST1与葫芦科物种亲缘关系最近。CRISPR/Cas9敲除黄瓜同源基因CsaV3_6G008900后，黄瓜种皮变薄而且种皮木质素、纤维素和半纤维素的含量显著降低，细胞排列松散并出现空洞。【结论】*CmoNST1*是调控南瓜种皮发育的关键基因，其突变体*Cmonst1*虽保留NAM结构域，但因C端截短导致磷酸化调控潜力丧失，蛋白理化性质改变，可能使其丧失转录激活功能，进而导致裸仁表型。

关键词： 南瓜；裸仁；*CmoNST1*；NAC；种皮发育；种皮成分；CRISPR/Cas9；功能丧失型突变
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0220

C-terminal Truncation of *CmoNST1* Leads to Hull-less Seeds in *Cucurbita moschata* Duch.

SHEN Qiong* LIU Ya-nan MENG Hong-yu
（*College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taiyuan* 030031）

Abstract: 【Objective】This study aimed to investigate the molecular basis of the hull-less seed trait in *Cucurbita moschata* by comparing the sequence, expression, and protein localization differences between the *NST1* alleles (*CmoNST1* and *Cmonst1*) from wild-type and mutant lines, with the goal of elucidating their functional divergence and providing a theoretical foundation for molecular breeding of hull-less *C. moschata*. 【Method】The *CmoNST1* and *Cmonst1* genes were cloned from the hulled inbred line HS-A and the hull-less line HLS-B, respectively. Sequence alignment was performed to identify variant characteristics, and protein domain architecture was predicted. Subcellular localization was predicted using bioinformatics tools. Tissue-specific expression patterns of both genes were compared via RT-qPCR. To investigate gene function, we knocked out the cucumber ortholog CsaV3_6G008900 using a CRISPR/Cas9 system with dual guide RNAs. After *Agrobacterium*-mediated transformation, positive mutants were identified by PCR. The gene's role was further evaluated by examining seed coat cellular structures with 3D micro-CT imaging and measuring lignin, cellulose, and hemicellulose content. 【Result】The wild-type mediated transformation, positive mutants were identified by PCR. *CmoNST1* (1 185 bp) and mutant *Cmonst1* (1 072 bp) encode 394 and 112 amino acids, respectively. Both proteins contain a conserved NAM domain and lack transmembrane domains or signal peptides; their secondary structures are mainly composed of random coils and α-helices. Physicochemical analysis indicated that CmoNST1 is an unstable acidic protein,

收稿日期：2026-02-24
基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（32202490）
*通信作者：申琼 shenqiong08@163.com

whereas Cmonst1 is a stable basic protein. Subcellular localization revealed that CmoNST1 is predominantly nuclear, while Cmonst1 distributes in both the nucleus and cytoplasm. Expression analysis showed that transcript levels of both genes are significantly higher in the seed coat than in other tissues. Phylogenetic analysis indicated that CmoNST1 is most closely related to homologs from other Cucurbitaceae species. Knockout of the cucumber ortholog CsaV3_6G008900 using CRISPR/Cas9 resulted in thinner seed coats, significantly reduced lignin, cellulose, and hemicellulose content, and loosely arranged seed coat cells with visible cavities.【Conclusion】These results demonstrate that *CmoNST1* is a key regulator of seed coat development in *C. moschata*. Although the mutant allele *Cmonst1* retains the NAM domain, its C-terminal truncation eliminates phosphorylation regulatory potential and alters physicochemical properties, which likely disrupts its transcriptional activation function and leads to the hull-less phenotype.

Keywords: *Cucurbita moschata*; hull-less; *CmoNST1*; NAC; seed coat development; seed coat composition; CRISPR/Cas9; loss-of-function mutation

南瓜（*Cucurbita moschata* Duch.），又名中国南瓜，起源于美洲，全球种植范围广泛，是具有重要经济价值的南瓜属栽培种之一。其种子富含蛋白质、不饱和脂肪酸及多种矿物质（如钾、磷、铁等），并含有多种生物活性成分，兼具营养与功能价值，是食品及制药工业的重要原材料之一。[1-3]。选育籽粒营养价值高、产量高、适宜不同用途的籽用南瓜成为育种者的重要育种目标之一，而其中“裸仁”南瓜（种皮退化）特色资源的发现、选育并逐步发展，极大地提高了食品原料加工的便利性，为籽用南瓜的健康发展提供有力支撑[4-5]。

种皮作为进化中相对保守的器官，其发育受到精细的遗传调控[6-8]。本团队前期研究表明，南瓜裸仁性状由单个隐性核基因（N）控制；与正常南瓜种皮典型的5层结构（表皮层E、下皮层H、厚壁组织层S、薄壁组织层A、绿色组织层C）相比，裸仁突变体的种皮发生了明显改变。裸仁南瓜的种皮在发育过程中发生严重退化，各结构层坍塌成膜状[9-11]。同时其纤维素与木质素含量及相关合成酶，如苯丙氨酸解氨酶（PAL）、4-香豆酸辅酶A连接酶（4CL）、肉桂酸-4-羟化酶（C4H）、肉桂醇脱氢酶（CAD）和过氧化物酶（POD）的酶活性均显著降低[5]。通过图位克隆，在南瓜17号染色体上鉴定到一个编码NAC家族转录因子的候选基因CmoCh17G004790。该转录因子被证实为胞壁加厚促进因子1（*NST1*），本团队将该基因命名为*CmoNST1*。序列分析结果显示，野生型与裸仁突变体在*CmoNST1*的基因组DNA序列上并无差异，但其转录本在裸仁突变体种皮中发生了种皮特异性可变剪接，导致编码序列缺失了113 bp，这可能是产生功能缺陷蛋白的原因。转录组分析结果进一步提示，*CmoNST1*可能是调控木质素生物合成及次生细胞壁形成的核心因子，并与其他NAC、MYB转录因子共同构成复杂网络[11]。

尽管*CmoNST1*基因在调控南瓜种皮发育中的功能已得到初步确认，但其在裸仁与野生型种皮形成过程中的具体作用机制尚不明确。该基因在野生型与裸仁突变体之间的功能差异、其导致种皮结构缺失的内在细胞与分子原因有待进一步深入解析。因此，本研究通过克隆与鉴定野生型和裸仁突变体中*CmoNST1*基因，并从序列特征、表达模式和亚细胞定位等方面对二者进行比较分析，以期助力解析裸仁性状形成的分子机制，深化对植物种皮发育调控途径的理解，为裸仁南瓜分子育种提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

南瓜有种皮材料HS-A和裸仁材料HLS-B由本课题组提供。

1.2　方法

1.2.1　*CmoNST1*和*Cmonst1*基因鉴定　课题组前期在南瓜多组学联合分析基础上，挖掘到裸仁调控候选基因*CmoNST1*。通过葫芦科基因库中国南瓜（*Cucurbita moschata* Rifu）基因组数据库（http://cucurbitgenomics.org/organism/9）下载南瓜基因组信息数据文件，并下载参考基因的编码序列，对比野生型*CmoNST1*、裸仁突变体*Cmonst1*和参考基因序列。

1.2.2　南瓜总RNA提取及反转录　挑选饱满正常的种子，浸种催芽后播种于50孔穴盘，待植株长至两叶一心时定植。取人工自交授粉后20 d（days post

anthesis, DPA）的根、茎、叶、花和种皮，于研钵中加入液氮充分研磨，利用TRNzol Universal（TIANGEN）提取总RNA，通过1.5%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性和纯度后，选取高质量RNA，参照Prime Script™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒（TaKaRa）说明书反转录合成cDNA，于-20 ℃保存备用。

1.2.3 南瓜*CmoNST1*克隆、回收及测序 利用Primer Premier 5.0软件设计特异性克隆引物（附表1）。以反转录cDNA为模板进行PCR扩增，50 μL体系包括上下游引物各2 μL（10 μmol/L）、Green mix 25 μL、cDNA 2 μL、ddH_2O 19 μL；扩增程序为：95 ℃ 预变性3 min；95 ℃变性30 s，57.5 ℃退火30 s，72 ℃延伸1 min 20 s，35个循环；72 ℃终延伸，10 min。产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后，使用天根胶回收试剂盒进行纯化。将回收片段连接至pMD18-T载体，并转化大肠杆菌DH5α感受态细胞。选择阳性克隆菌液送生工生物工程（上海）股份有限公司测序。

1.2.4 南瓜*CmoNST1*基因生物信息学分析 基于附表2所示的在线平台，解析野生型CmoNST1和突变体Cmonst1蛋白结构特征。利用NCBI的Protein BLAST对二者氨基酸序列进行同源比对，并获取其他物种中相似度较高的同源序列。使用ClustalX 2.1软件进行多序列比对，经GeneDoc美化后，在MEGA 7.0中以邻接法构建系统进化树（Bootstrap=1 000）。

1.2.5 亚细胞定位分析 采用农杆菌（GV3101）介导的瞬时转化体系。将构建的融合表达载体*35S*::*CmoNST1*-GFP（野生型）、*35S*::*Cmonst1*-GFP（突变体）以及空载体对照*35S*-GFP分别电转化至农杆菌，于25 ℃培养48 h。菌体经离心收集后，用含120 μmol/L乙酰丁香酮的10 mmol/L $MgCl_2$溶液重悬，调整OD_{600}至0.6。选取4周龄健康烟草叶片，使用去针头注射器从下表皮注射菌液。注射后植株置于弱光条件下培养48 h。剪取注射区叶片制作临时装片，于激光共聚焦显微镜下观察，采集GFP荧光信号，分析CmoNST1及Cmonst1蛋白的亚细胞分布。

1.2.6 实时荧光定量PCR 选取南瓜根、茎、叶、花、种皮组织，经RNAprep Pure试剂盒（TIANGEN）提取总RNA后，用PrimeScript™ RT试剂盒（宝日医生物技术）反转录为cDNA。使用Primer 5.0设计*CmoNST1*和*Cmonst1*特异性qPCR引物，以*CmoActin*基因作为内参（附表1）。qPCR采用TB Green Premix Ex Taq II（TaKaRa）进行实时荧光定量PCR，反应程序为：95 ℃ 15 s；60 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，45个循环。设置3次生物学重复与技术重复，数据采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法分析获得基因相对表达量。

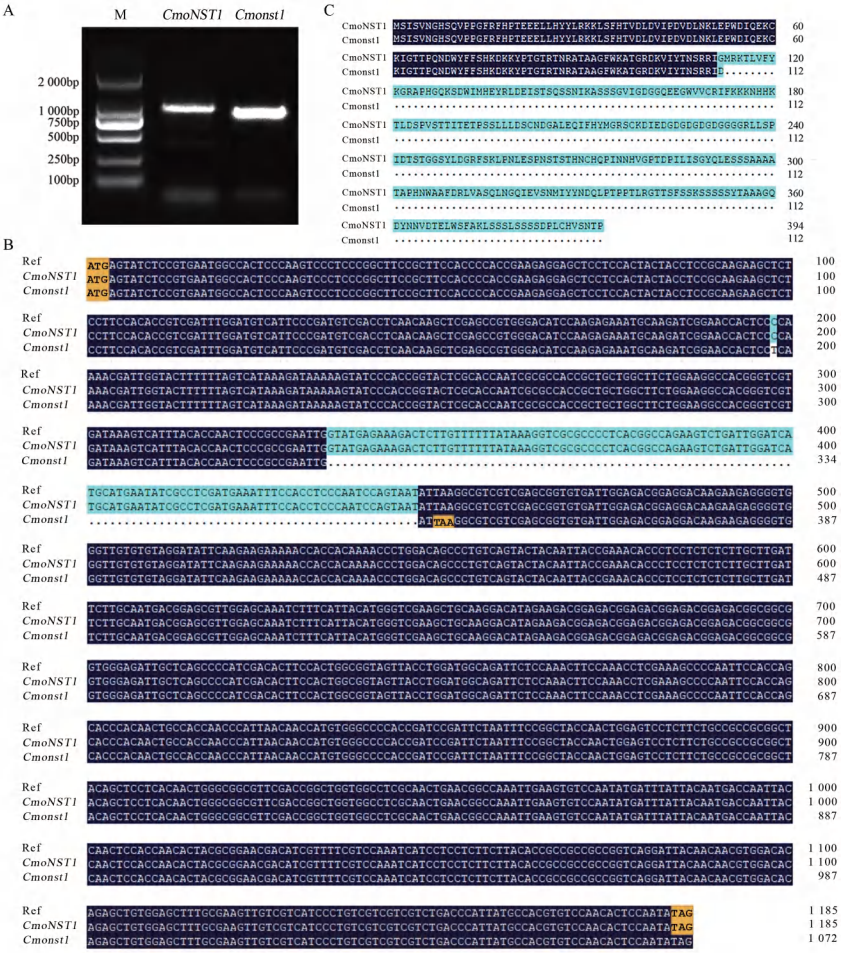
1.2.7 转基因载体构建与鉴定 由于南瓜转基因体系尚未建立，而黄瓜与南瓜同属葫芦科且亲缘关系较近，因此基于前期同源性分析，本团队选择黄瓜基因CsaV3_6G008900作为功能验证的靶标。以CsaV3_6G008900为靶标，利用CRISPR-P2.0在线工具，在其编码区（CDS）的外显子序列中，设计并筛选靠近起始密码子（ATG）且预测脱靶效应低的sgRNA靶点，选取最优靶点CsaV3_6G008900-QC1和CsaV3_6G008900-QC2，分别合成其寡核苷酸序列（附表1），通过酶切-连接法克隆至植物CRISPR-Cas9表达载体的sgRNA表达盒中，构建靶向该基因的双靶点敲除载体。随后，将上述重组载体及空载体对照通过电转法导入农杆菌C58菌株。利用已建立的黄瓜农杆菌介导遗传转化体系，使用该工程菌液侵染黄瓜外植体。对抗性筛选再生的植株，通过特异引物PCR筛选转基因阳性苗，最终获得基因编辑突变体株系。

1.2.8 数据统计分析 使用Microsoft Excel 2019和SPSS 27.0软件进行统计分析，用GraphPad Prism 9.5软件绘图。

2 结果

2.1 基因克隆及序列分析

以野生型和裸仁突变体的种皮cDNA为模板，克隆获得长度约为1 100 bp的目的片段（图1-A）。测序结果显示，野生型*CmoNST1*全长1 185 bp，编码394个氨基酸；突变体*Cmonst1*全长1 072 bp，较野生型缺失113 bp的编码区序列（图1-B）。该缺失导致阅读框移码，在新的阅读框中，于原野生型第112个氨基酸对应的密码子位置附近提前出现终止密码子（TAA），因此突变体仅编码一个112 aa的截短蛋白（图1-C）。与南瓜参考基因CmoCh17G004790相比，*CmoNST1*序列完全一致；而*Cmonst1*除113 bp



A：*CmoNST1*和*Cmonst1*全长CDS扩增产物电泳检测；B：*CmoNST1*、*Cmonst1*与参考核苷酸序列比对；C：CmoNST1和Cmonst1蛋白序列比对；Ref：参考序列

A: Electrophoresis analysis of full-length CDS amplification products of *CmoNST1* and *Cmonst1*. B: Nucleotide sequence alignment of *CmoNST1*, *Cmonst1*, and the reference nucleotide sequence. C: Protein sequence alignment of CmoNST1 and Cmonst1. Ref: Reference sequence

图1　南瓜*CmoNST1*和*Cmonst1*基因克隆和序列分析

Fig. 1　Gene cloning and sequence analysis of *CmoNST1* and *Cmonst1* in pumpkin

缺失外，还存在一个单核苷酸变异，序列相似度为90.5%。

2.2　蛋白理化性质分析

通过ExPASy ProtParam在线工具对CmoNST1和Cmonst1蛋白的理化性质进行预测，结果显示，CmoNST1蛋白由394个氨基酸残基构成，相对分子质量为43.35 kD，分子式为$C_{1899}H_{2926}N_{534}O_{610}S_{11}$。等电点（isoelectric point, pI）为6.20，属酸性蛋白。氨基酸组成分析表明，丝氨酸（Ser）含量最高（12.7%），甲硫氨酸（Met）含量最低（1.3%）。该蛋白携带负电荷的氨基酸残基（天冬氨酸Asp和谷氨酸Glu）共44个，携带正电荷的氨基酸残基（精氨酸Arg和赖氨酸Lys）共38个。蛋白不稳定指数为51.51（>40），推测其为不稳定蛋白。脂肪系数为66.09。Cmonst1蛋白由112个氨基酸残基组成，相对分子质量为13.11 kD，分子式为$C_{593}H_{902}N_{164}O_{170}S_2$。pI为9.04，属于碱性蛋白。氨基酸组成分析表明，Lys和Thr的含量最高（8.9%），色氨酸（Trp）含量最低（1.1%）。不含吡咯赖氨酸（Pyl）和硒半胱氨酸（Sec）等稀有氨基酸。该蛋白携带负电荷的氨基酸残基（Asp和Glu）共14个，携带正电荷的氨基酸残基（Arg和Lys）共17个。蛋白不稳定指数为

32.76（<40），推测其为稳定蛋白，脂肪系数为64.38。

借助TMHMM在线工具对蛋白结构进行分析，结果显示CmoNST1与Cmonst1蛋白均未预测到跨膜结构域（附图1-A,B）。CmoNST1和Cmonst1的蛋白疏水性平均值分别为-0.614和-0.812，说明两种蛋白都为亲水性蛋白（附图1-C,D）。

借助SignalP-6.0在线工具进行信号肽预测，结果显示CmoNST1和Cmonst1蛋白均不含信号肽（附图2-A,B）。进一步利用Netphos3.1分析其磷酸化位点，结果表明CmoNST1蛋白存在61个潜在磷酸化位点，包括丝氨酸（Ser）39个、苏氨酸（Thr）19个及酪氨酸（Tyr）3个；Cmonst1蛋白共预测到12个磷酸化位点，其中丝氨酸5个、苏氨酸6个、酪氨酸1个（附图2-C,D）。

2.3 CmoNST1蛋白结构域、二级、三级结构预测

结构域作为蛋白质中能独立折叠并执行特定功能的功能单元，是解析蛋白质功能的重要切入点。通过NCBI CD-Search在线工具对CmoNST1蛋白进行保守结构域预测，结果表明该野生型CmoNST1蛋白和突变体Cmonst1蛋白都含有典型的No Apical Meristem（NAM）保守结构域（附图3-A,B），表明其属于NAC转录因子超家族。结合前期序列分析，尽管113 bp的缺失造成了突变体蛋白C端截短，但NAM结构域本身的编码序列并未被破坏。这说明，突变体功能丧失并非源于DNA结合核心域（NAM）的破坏，而很可能归因于C端调控区域的缺失，该区域可能包含对转录激活至关重要的位点。

对CmoNST1和Cmonst1蛋白的二级结构进行分析预测（附图3-C,D），发现两者均具有极高的无规则卷曲含量（CmoNST1 81.98%，Cmonst1 73.21%），而规则的α-螺旋和延伸链占比较低，这两种蛋白可能是结构柔性较高的分子。对比两者，Cmonst1蛋白的α-螺旋（从7.61%增至8.04%）和延伸链（从10.41%增至18.75%）比例略有增加，同时无规则卷曲比例相应降低，说明该突变可能使蛋白质的局部结构变得略微有序，并未显著改变蛋白质整体的二级结构构象。

在SWISSMODEL系统中，分别以笋瓜（*Cucurbita maxima*）和木豆（*Cajanus cajan*）的NAC结构域蛋白为模板，成功构建野生型CmoNST1及突变体Cmonst1的三维结构（附图3-E,F）。建模数据显示，尽管突变体与模板的序列一致性（90.09%）略低于野生型（96.95%），且覆盖率也稍低，但其核心NAC结构域的折叠方式与野生型高度相似。综合上述结构域、二级及三级结构分析结果表明，113 bp缺失导致的移码突变，使Cmonst1蛋白仅保留了N端的NAM结构域（DNA结合核心域），而C端的大部分序列（包括转录调控区）因移码而缺失并提前终止。该突变并未破坏NAM结构域的折叠方式，但足以移除C端关键的转录调控区。据此推测，该突变导致Cmonst1蛋白保留了N端的DNA结合域，而缺失了C端的转录激活域。这种“DNA结合域完整、转录激活域缺失”的结构特征，可能是裸仁性状形成的分子基础。然而，突变体蛋白是否仍具备正常的DNA结合活性，尚需进一步实验验证。

2.4 序列比对和系统进化树

在NCBI数据库中，使用BLASTP工具，以CmoNST1的氨基酸序列作为查询序列进行同源比对。根据E值及相似度比对结果，筛选出来自14种不同植物的、同源性较高的氨基酸序列（图2）。结果显示，*CmoNST1*和*Cmonst1*编码蛋白的相似度为71.5%；与葫芦科植物西葫芦（Cp4.1G12g04350.1）的同源性最高，相似度为99.42%，与笋瓜（RimuC17G004780.1）、灰籽南瓜（KAG7013810.1）、黄瓜（CsaV3_6G008900.1）和甜瓜（KAL4015115.1）的相似度分别为96.58%、93.2%、82.1%和80.2%，而与木豆（XP 020227650.1）的同源性最低，仅为55.13%。系统进化分析进一步证实，*CmoNST1*和*Cmonst1*与上述葫芦科物种聚集于同一进化分支，亲缘关系较近，符合物种进化规律。

2.5 南瓜CmoNST1亚细胞定位

将重组质粒pART-CAM-EGFP转化农杆菌，并分别以*35S*-GFP和*35S*::*CmoNST1*/*Cmonst1*-GFP作为对照与实验组，在烟草表皮细胞中瞬时表达目标蛋白。亚细胞定位结果显示（图3），CmoNST1蛋白的绿色荧光主要分布在烟草细胞的细胞核中，在细胞质中也有微弱信号；而Cmonst1蛋白的荧光在细胞核、细胞质，未观察到明显的定位特异性改变。上述结果表明，CmoNST1是一个典型的核定位蛋白，

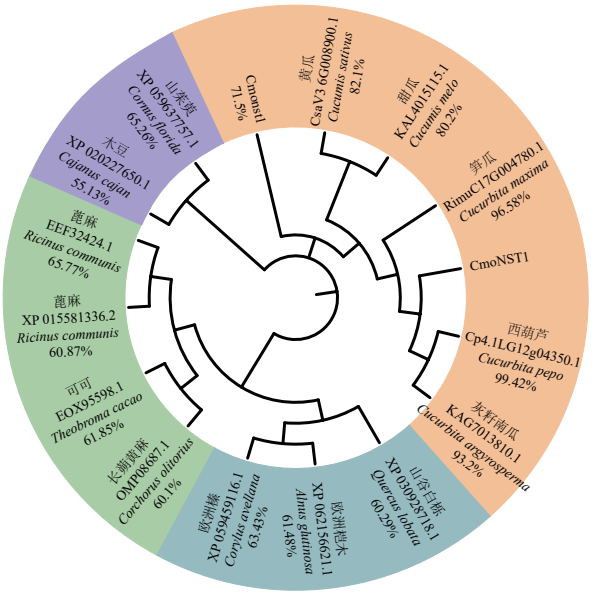
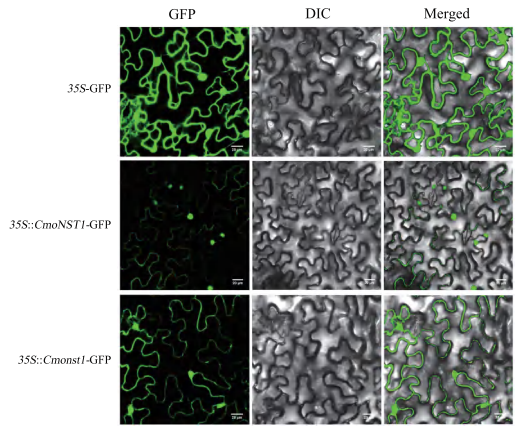


图2　CmoNST1的系统进化树分析

Fig. 2　Phylogenetic tree analysis of CmoNST1



从左到右分别为GFP绿色荧光蛋白、明场和叠加图。比例尺=20.0 μm

From left to right: GFP green fluorescent protein, bright field, and merge. Scale bar = 20.0 μm

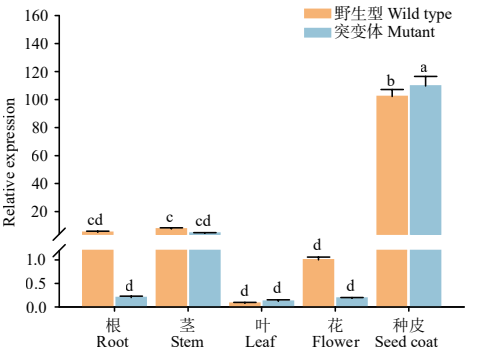
图3　CmoNST1和Cmonst1的亚细胞定位

Fig. 3　Subcellular localization of CmoNST1 and Cmonst1

而C端截短未显著影响其进入细胞核的能力，但其在细胞质中的信号增强可能与蛋白结构改变有关。

2.6　*CmoNST1* 基因表达模式分析

RT-qPCR分析表明，*CmoNST1* 和 *Cmonst1* 在所有器官中均有表达（图4）。*CmoNST1* 和 *Cmonst1* 在根、茎、叶、花、种皮中表达趋势是一致的，在种皮中表达量最高，其次为茎、根、花，在叶中表达量最低。在野生型HS-A中，*CmoNST1* 在种皮中的表达量分别为茎、根、花和叶中表达量的13.44倍、19.68倍、102.17倍和1 311.21倍。在突变体HLS-B中，*Cmonst1* 在种皮中的表达量分别为茎、根、花和叶中表达量的23.84倍、551.58倍、590.13倍和914.71倍。在裸仁突变体材料中，种皮中的表达量明显高于其他组织。



不同小写字母表示差异显著（P<0.05）

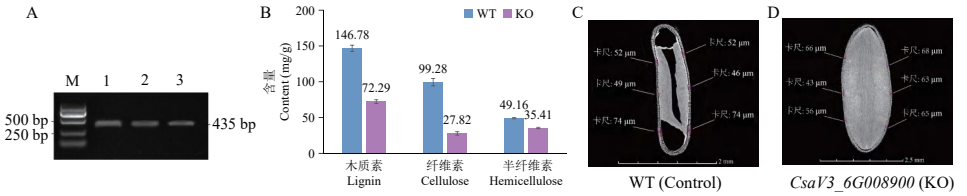
Different lower letters indicate significant differences (P<0.05)

图4　*CmoNST1*（野生型）和 *Cmonst1*（突变体）组织特异性表达分析

Fig. 4　Tissue-specific expression analysis of *CmoNST1* (wild type) and *Cmonst1* (mutant)

2.7　黄瓜CsaV3_6G008900（*CmoNST1* 同源基因）敲除株系的表型分析

通过PCR扩增检测黄瓜基因敲除T_1代株系中目标基因CsaV3_6G008900的特异性片段（预期产物大小为435 bp）。琼脂糖凝胶电泳结果显示，在突变体株系中检测到目标条带（图5-A）。通过CT扫描比较基因敲除植株与野生型黄瓜（9930）成熟种子的种皮结构，并测定两者种皮中木质素、纤维素和半纤维素的含量。结果显示，种皮木质素、纤维素和半纤维素的含量变化趋势与种皮厚度一致（图5-B）。野生型种子种皮厚度约为60.2 μm，结构完整，种皮细胞规则，内容物填充正常（图5-C）；而基因敲除T_1代种子种皮厚度降至约57.8 μm，种皮细胞内容物明显缺失，细胞排列松散，出现空洞结构，种仁发育不完整（图5-D）。上述结果表明，敲除 *CmoNST1* 在黄瓜中的直系同源基因CsaV3_6G008900后，种皮厚度与木质素含量等指标均发生显著变化。这进一



A：载体鉴定；B：种皮木质素、纤维素和半纤维素含量；C：对照黄瓜种子结构；D：突变体黄瓜种子结构；M：DNA marker；1–3：载体鉴定；WT（Control）：对照野生型黄瓜种子；KO：敲除CsaV3_6G008900的突变体黄瓜种子

A: Characterization of the vector. B: Contents of lignin, cellulose, and hemicellulose in the seed coat. C: Seed structure of the control cucumber. D: Seed structure of the mutant cucumber. M: DNA marker. 1–3: Characterization of the vector. WT (Control): Wild-type cucumber seed. KO: Mutant cucumber seed with CsaV3_6G008900 knockout

图5 CsaV3_6G008900基因敲除对种皮发育的影响

Fig. 5 Effect of CsaV3_6G008900 knockout on seed coat development

步证实了*CmoNST1*及其同源基因在葫芦科植物种皮发育中具有功能保守性。

3 讨论

本研究克隆了有种皮南瓜中的*CmoNST1*及其裸仁突变等位基因*Cmonst1*。尽管突变体中检测到*Cmonst1*转录本，但该转录本能否翻译出截短蛋白并在体内稳定发挥功能尚不明确。

真核细胞中存在无义介导的mRNA降解（NMD）机制，可识别含有提前终止密码子的异常转录本并使其降解[12]。即便少量截短蛋白得以合成，其C端截短也可能影响蛋白的整体稳定性，使其易被泛素–蛋白酶体系统（UPS）识别并降解[13]。然而，保守结构域预测显示，突变体蛋白仍保留完整的NAM结构域（位于N端），三维结构建模和二级结构预测进一步表明，C端的缺失并未影响该核心结构域的正常折叠。亚细胞定位结果也证实突变体蛋白仍具备进入细胞核的能力。这意味着，若该截短蛋白能够逃逸NMD和UPS两大质控系统并在体内稳定存在，其DNA结合及核定位功能可能得以保留。但这种“核心保留、调控末端缺失”的突变方式是否影响其转录激活功能尚不明确。后续的蛋白理化性质分析，为功能缺失假说提供了间接证据。

蛋白理化性质分析显示，野生型CmoNST1为不稳定的酸性蛋白，而突变体Cmonst1为稳定的碱性蛋白。等电点从酸性向碱性的转变，可能影响蛋白与带负电荷的DNA骨架的结合能力[14]。此外，CmoNST1含有61个潜在磷酸化位点，远多于Cmonst1的12个。C端大量磷酸化位点的丢失，可能导致Cmonst1无法有效响应上游信号通路的磷酸化调控，从而削弱其转录激活能力[15-16]。尽管Cmonst1仍为亲水蛋白且不含跨膜域，但其稳定性的提高可能反而不利于其作为转录因子完成快速更新和降解的动态调控过程[17]。同时，亚细胞定位显示CmoNST1主要定位于细胞核，而Cmonst1在细胞核和细胞质中均有分布，这种分布模式的改变可能干扰其正常转录调控功能。

从功能层面分析，*CmoNST1*和*Cmonst1*在种皮中显著高表达，与已知*NST*类基因表达规律一致[18]。在裸仁突变体中，*Cmonst1*在种皮中的表达量依然显著高于其他组织，表明突变体表型并非由于基因表达缺失，综合序列、结构及理化性质等间接证据，推测这可能是由C端截短导致蛋白功能丧失，但其转录激活功能仍有待后续实验直接验证。

进一步的证据支持这一功能缺失假说。显微CT扫描结果显示，基因功能缺失导致种皮变薄，细胞排列松散并出现空洞，种皮木质素、纤维素和半纤维素含量显著降低，推断*CmoNST1*可能直接激活种皮次级细胞壁合成相关的木质素生物合成基因。该结果与拟南芥*NST1/NST2*促进厚壁组织的次生壁增厚的作用高度相似[18]。Zhong等[19]证实，*NST1*可直接结合于木质素合成基因的启动子区域并激活其表达。因此，*CmoNST1*很可能通过类似的调控机制，维持种皮机械强度；当其功能受损时，木质素含量下降，种皮细胞因缺乏支撑而形成空洞，最终导致裸仁表型。然而，*CmoNST1*与下游靶基因的直接相互作用尚需通过EMSA或ChIP-qPCR等方法进一步验证。

从进化视角来看，*CmoNST1*与葫芦科物种等聚为一支，相似度较高。结合黄瓜中敲除该同源基因

能重现种皮缺陷表型的结果，说明*NST*类转录因子在葫芦科作物种皮发育中的功能具有保守性。为利用基因编辑技术改良瓜类作物种皮性状提供了重要的理论依据。

本研究为理解可变剪接在NAC转录因子功能调控中的作用提供了新证据。本研究发现，可变剪接导致*Cmonst1*开放阅读框破坏及翻译提前终止，改变了该转录因子的功能完整性。这一发现揭示了可变剪接在转录后水平调控种皮性状的潜在机制。可变剪接广泛参与植物生长发育、胁迫应答等多种生理过程[20-27]，NAC转录因子家族在植物发育与胁迫响应中发挥枢纽作用[28-29]。本研究进一步表明，可变剪接可直接作用于这一关键转录因子家族，在转录后水平精准干预其功能。该发现拓展了可变剪接在植物发育调控中的功能维度，为深入理解NAC家族转录因子的功能多样性提供了新视角。后续将利用原位杂交揭示基因表达的组织特异性差异，并通过转录激活活性检测明确可变剪接事件是否产生有功能的蛋白，从而深入解析裸仁南瓜种皮退化的分子机制。

4　结论

裸仁南瓜中*Cmonst1*因113 bp缺失导致C端截短，编码蛋白由394个氨基酸缩短至112个氨基酸。该蛋白虽保留NAM结构域与核定位能力，但可能丧失转录激活功能，表现为“核心保留、调控末端缺失”的功能丧失型突变。*CmoNST1*在种皮特异性高表达，可能通过调控木质素等合成维持种皮完整性，其C端截短是裸仁性状形成的关键因素之一。

文章所有附图附表请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260707105345_NewsFile_59.pdf）。

参考文献

[1] Singh A, Kumar V. Pumpkin seeds as nutraceutical and functional food ingredient for future: a review [J]. Grain Oil Sci Technol, 2024, 7(1): 12-29.

[2] Bergantin C, Maietti A, Tedeschi P, et al. HPLC-UV/Vis-APCI-MS/MS determination of major carotenoids and their bioaccessibility from “delica” (*Cucurbita maxima*) and “violina” (*Cucurbita moschata*) pumpkins as food traceability markers [J]. Molecules, 2018, 23(11): 2791.

[3] Vinayashree S, Vasu P. Biochemical, nutritional and functional properties of protein isolate and fractions from pumpkin (*Cucurbita moschata* var. *kashi* Harit) seeds [J]. Food Chem, 2021, 340: 128177.

[4] Zraidi A., Pachner M, Lelley T. On the genetics and histology of the hull-less character of styrian lipid-pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) [J]. Cucurbit Genet Coop Rep, 2003, 26: 57-61.

[5] 申琼. 薄种皮南瓜种皮发育生理及分子标记筛选 [D]. 太谷: 山西农业大学, 2019.
Shen Q. Developmental physiology and screening molecular marker for hull-less seeds of *Cucurbita moschata* [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2019.

[6] Huss JC, Gierlinger N. Functional packaging of seeds [J]. New Phytol, 2021, 230(6): 2154-2163.

[7] Figueiredo DD, Sharma RA. The mysterious dialogue between the embryo, endosperm, and seed coat, and its implications for seed traits [J]. J Exp Bot, 2026, 77(7): 1976-1990.

[8] North H, Baud S, Debeaujon I, et al. *Arabidopsis* seed secrets unravelled after a decade of genetic and omics-driven research [J]. Plant J, 2010, 61(6): 971-981.

[9] Kreft M, Zorec R, Janeš D, et al. Histolocalisation of the oil and pigments in the pumpkin seed [J]. Ann Appl Biol, 2009, 154(3): 413-418.

[10] Shen Q, Wu LY, Zhao XH, et al. Comparative analysis of electron microscopic structure of seed testa, lignin and biosynthesis-related enzyme activities in hulled and hull-less seeds of *Cucurbita moschata* [J]. Sci Hortic, 2019, 245: 137-143.

[11] Shen Q, Weng YQ. Alternative splicing of *NAC* transcription factor gene *CmNST1* is associated with naked seed mutation in pumpkin, *Cucurbita moschata* [J]. Genes, 2023, 14(5): 962.

[12] Raxwal VK, Riha K. The biological functions of nonsense-mediated mRNA decay in plants: RNA quality control and beyond [J]. Biochem Soc Trans, 2023, 51(1): 31-39.

[13] Wang XW, Liu X, Song KX, et al. An insight into the roles of ubiquitin-specific proteases in plants: development and growth, morphogenesis, and stress response [J]. Front Plant Sci, 2024, 15: 1396634.

[14] Huang WZ, Miao M, Kud J, et al. *SlNAC1*, a stress-related transcription factor, is fine-tuned on both the transcriptional and the post-translational level [J]. New Phytol, 2013, 197(4): 1214-1224.

[15] Seet BT, Dikic I, Zhou MM, et al. Reading protein modifications with interaction domains [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(7): 473-483.

[16] Mittag T, Pappu RV. A conceptual framework for understanding phase separation and addressing open questions and challenges [J]. Mol Cell, 2022, 82(12): 2201-2214.

[17] Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, et al. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse [J]. Trends Plant Sci, 2005, 10(2): 79-87.

[18] Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K, et al. The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence [J]. Plant Cell, 2005, 17(11): 2993-3006.

[19] Zhong RQ, Lee C, Ye ZH. Global analysis of direct targets of secondary wall NAC master switches in *Arabidopsis* [J]. Mol Plant, 2010, 3(6): 1087-1103.

[20] Yu YT, Guo SG, Ren Y, et al. Quantitative transcriptomic and proteomic analysis of fruit development and ripening in watermelon (*Citrullus lanatus*) [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 818392.

[21] Ahiakpa JK, Munir S, Karikari B, et al. Alternative splicing occurs in auxin-mediated trade-off between fruit development and quality in tomato [J]. BMC Plant Biol, 2025, 25: 1241.

[22] Qüesta JI, Song J, Geraldo N, et al. *Arabidopsis* transcriptional repressor VAL1 triggers Polycomb silencing at *FLC* during vernalization [J]. Science, 2016, 353(6298): 485-488.

[23] Liu L, Wu DP, Gu YJ, et al. Comprehensive profiling of alternative splicing landscape during secondary dormancy in oilseed rape (*Brassica napus* L.) [J]. Mol Breeding, 2022, 42(8): 44.

[24] James AB, Sharples C, Laird J, et al. *REVEILLE2* thermosensitive splicing: a molecular basis for the integration of nocturnal temperature information by the *Arabidopsis* circadian clock [J]. New Phytol, 2024, 241(1): 283-297.

[25] van der Hoven TC, McFarlane ZG, Dinge S, et al. Temperature-dependent alternative splicing enables circadian adaptation to ambient temperature [J]. Plant Physiol, 2026, 200(2): kiaf689.

[26] Xu WB, Wang M, Zhang XH, et al. Unraveling branch point-driven SR45a splicing dynamics in heat stress for plant adaptation [J]. Sci Adv, 2026, 12(13): eadz7859.

[27] Huang C, Tang JW, Sun WQ, et al. Gibberellin modulates the post-transcriptional regulation of CsHDZ34 to positively regulate bud break in tea plants [J]. New Phytol, 2026, 249(4): 1850-1870.

[28] Reboledo G, Agorio A, Ponce De León I. Moss transcription factors regulating development and defense responses to stress [J]. J Exp Bot, 2022, 73(13): 4546-4561.

[29] Lu L, Fang JB, Xia N, et al. Phosphorylation of the transcription factor OsNAC29 by OsMAPK3 activates diterpenoid genes to promote rice immunity [J]. Plant Cell, 2024, 37(1): koae320.

（责任编辑　高洁）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):207-215

钙调素结合蛋白StIQD20介导马铃薯耐盐性的功能研究

冯瑞云 李京昊 王紫腾 宋宇鹏 侯雅静 段永红 宋倩娜 梅超*
（山西农业大学农学院 马铃薯遗传改良与种质创新山西省重点实验室，太原 030031）

摘 要：【目的】揭示马铃薯*StIQD20*基因在盐胁迫应答中的功能，明确其增强马铃薯耐盐性的内在机制，为马铃薯耐盐分子育种提供新的基因资源和遗传材料。【方法】克隆*StIQD20*基因，构建过表达载体，转化二倍体野生型马铃薯‘C65’获得阳性植株，对比分析不同盐胁迫下过表达植株与野生型植株的表型性状、生理生化指标，进行Ca^{2+}表型恢复实验与盐胁迫相关基因表达量测定。【结果】获得5棵过表达植株，RT-qPCR检测表明过表达植株*StIQD20*基因表达量为野生型植株的1.5-2.9倍；盐胁迫下过表达植株的株高、鲜重及叶片数均高于野生型，在盐胁迫条件下，施加100 μmol/L $CaCl_2$较50 μmol/L能有效地缓解幼苗受害程度；不同盐胁迫浓度处理下，过表达植株的抗氧化酶活性与脯氨酸含量显著高于野生型，丙二醛含量显著低于野生型；过表达植株中盐胁迫响应基因*SnRK2s*、*ABF4*、*ABI3*、*MYB2*和*DREB2A*的表达水平均高于野生型，*ABI5*基因的表达量相对较低。【结论】StIQD20通过调控Ca^{2+}信号及抗氧化防御系统，促进渗透调节物质积累并调控相关基因表达，从而显著增强马铃薯的耐盐性。

关键词：马铃薯；*StIQD20*；愈伤组织转化体系；盐胁迫；Ca^{2+}

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1346

Functional Study of the Calmodulin-binding Protein StIQD20 in Mediating Salt Tolerance in Potato

FENG Rui-yun LI Jing-hao WANG Zi-teng SONG Yu-peng HOU Ya-jing DUAN Yong-hong SONG Qian-na MEI Chao*
（*College of Agriculture / Key Laboratory of Potato Genetic Improvement and Germplasm Innovation in Shanxi Province, Shanxi Agricultural University, Taiyuan* 030031）

Abstract:【Objective】This study aimed to elucidate the function of the potato *StIQD20* gene in response to salt stress, clarify its intrinsic mechanism for enhancing potato salt tolerance, and provide new gene resources and genetic materials for molecular breeding of salt-tolerant potatoes.【Method】The *StIQD20* gene was cloned, and an overexpression vector was constructed. The vector was transformed into the diploid wild-type potato ‘C65’ to obtain positive plants. Phenotypic traits and physiological and biochemical indicators of the overexpression plants and wild-type plants under different salt stress conditions were compared and analyzed. A Ca^{2+} phenotypic recovery experiment and expression level measurement of salt stress-related genes were conducted.【Result】Five overexpression plants were obtained. RT-qPCR analysis showed that the expression level of the *StIQD20* gene in overexpression plants was 1.5-2.9 times higher than that in wild-type plants. Under salt stress, plant height, fresh weight, and number of blades of overexpression plants were higher than those of wild-type plants. The application of 100 μmol/L $CaCl_2$ was more effective than 50 μmol/L in alleviating seedling damage under salt stress conditions. Under different salt stress concentrations, the antioxidant enzyme activities and proline content in overexpression plants were significantly higher than those in wild-type plants, while malondialdehyde (MDA) content was significantly lower. The expression levels of salt stress-responsive genes *SnRK2s*, *ABF4*, *ABI3*, *MYB2*, and *DREB2A* in overexpression plants were higher than those in wild-type plants, while the expression level of the *ABI5* gene was relatively lower.

收稿日期：2025-12-10
基金项目：中央引导地方科技发展资金项目（YDZJSX2025D044），山西省重点实验室开放基金项目资助（ST202403），马铃薯遗传改良与种质创新山西省重点实验室项目（202304010921003），山西省农业关键核心技术攻关项目（NYGG30-02），山西省现代农业产业技术体系建设专项资金（2026CYJSTX06-11）
*通信作者：梅超 meichao@sxau.edu.cn

【Conclusion】 StIQD20 significantly enhances salt tolerance in potato by modulating Ca^{2+} signaling and the antioxidant defense system, promoting the accumulation of osmoregulatory substances, and modulating the expression of related genes.

Keywords: potato; *StIQD20*; callus transformation system; salt stress; Ca^{2+}

土壤盐分的升高会诱发渗透胁迫，损害水分吸收并引发细胞脱水，最终导致作物生长受到抑制和产量损失[1]。土壤盐碱化的加剧使粮食安全面临重大风险，亟待可持续的解决方案，面对盐碱化土地，耐盐作物具备长期适应性与产量稳定性，此类研究对于发展韧性农业具有重要意义[2]。马铃薯（*Solanum tuberosum* L.）是除禾本科作物外全球最重要的粮食作物，其对中度盐渍化土壤敏感[3]。土壤高盐会降低光合效率，诱导氧化损伤与加速衰老，对马铃薯的生理功能与营养生长产生负面影响，最终导致减产[4]。马铃薯的耐盐性依赖于离子稳态、渗透平衡和抗氧化防御机制等调节[5]。盐胁迫会诱导胞外Ca^{2+}内流，由CAM/CML蛋白感知并解码钙信号，通过CDPKs、CBL-CIPK等通路上调脯氨酸（PRO）合成关键酶的表达与活性，促进脯氨酸积累以维持渗透平衡[6]；同时激活SOD、POD等抗氧化酶系统，协同清除活性氧（ROS），从而增强植物耐盐性[7]。

IQD（IQ67-domain-containing protein）基因家族成员是植物特有的CAM/CML结合靶蛋白，广泛存在于高等植物中，通常以多基因家族的形式出现。其典型特征为包含1个由67个氨基酸构成的保守IQ67结构域，该结构域常以串联重复的方式排列。近年来，已在多个物种中完成了*IQD*基因家族全基因组鉴定，研究表明该家族成员的表达受盐胁迫显著诱导，并通过调控下游抗逆基因表达来增强植物的耐盐性[8]。在陆地棉中，*GhIQD31*与*GhIQD32*在盐胁迫下表达显著上调，通过正向调控抗氧化防御系统来维持细胞稳态[9]。在茶树中鉴定出的38个*CsIQD*基因中，部分成员在干旱和盐胁迫处理下表达量显著变化，推测它们通过整合钙信号和ABA信号通路来响应盐胁迫[10]。研究表明StIQD20可能通过介导钙信号通路，与ABA核心信号模块（如SnRK2-ABF/ABI通路）协同作用，共同激活下游耐盐相关基因的表达[11]。

SNF1-related protein kinase 2（SnRK2s）是ABA信号通路的核心激酶，行使调节气孔关闭、抑制生长、激活保护性基因表达等功能[12]。ABRE binding factor 4（ABF4）是SnRK2激酶的主要磷酸化底物之一，是维持植物细胞耐盐状态的关键蛋白[13]。Abscisic acid insensitive 5（ABI5）主要在植物幼苗期响应盐胁迫与ABA信号，通常与ABF协同作用，精细调控植物对于胁迫响应和生长发育的平衡[14]。Abscisic acid insensitive 3（ABI3）作为ABA信号通路中的正调控转录因子，在植物的抗旱耐盐中起重要作用，与ABI5相互作用，建立与维持马铃薯植株对于胁迫下的适应状态[15]。R2R3-MYB transcription factor 2（MYB2）主要功能是在植物受到盐胁迫诱导后，参与调控一系列涉及活性氧清除、离子稳态（如Na^+/K^+平衡）与渗透调节等生理过程[16]。DREbinding protein 2A（DREB2A）主要响应盐胁迫引起的渗透压与脱水信号，确保植物在盐胁迫下的多重保障[17]。*SnRK2s*、*ABF4*、*ABI3*、*MYB2*、*DREB2A*与*ABI5*这些基因构成了一个从信号感知、转导、转录调控到下游响应的完整网络，通过检测这些基因的表达变化，可以揭示*StIQD20*基因在抗盐信号通路中的重要功能。

在前期研究中，本团队通过分析马铃薯全基因组数据，成功鉴定出23个*StIQDs*基因。通过RT-qPCR实验证实了14个*StIQDs*对各种非生物胁迫具有不同程度的响应，发现在非生物胁迫下*StIQD20*的应激反应最为显著，并对Na^+及Ca^{2+}的刺激有明显响应。为研究*StIQD20*基因在盐胁迫响应中的生物学功能，本研究选用二倍体马铃薯品种‘C65’作为遗传转化受体，获得稳定过表达*StIQD20*基因的阳性株系，并分析这些转基因植株中多个盐胁迫相关基因的表达水平，旨在揭示*StIQD20*在逆境信号通路中的调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用植物材料为野生型二倍体马铃薯品种‘C65’组培苗，由山西农业大学农学院植物基因编辑实验室提供。菌株：大肠杆菌（*Escherichia coli*）

DH5α、根癌农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）GV3101。实验过程中所用抗生素为卡那霉素（Kanamycin）和利福平（Rifampicin）。RNA提取、质粒提取、琼脂糖凝胶回收等均使用TIANGEN公司快速提取试剂盒完成。反转录实验均用Promega公司的试剂盒完成。过表达载体pMDC85、Taq DNA聚合酶、T4-DNA连接酶、限制性内切酶等酶类物质、抗氧化酶活性检测试剂盒、渗透调节物质含量测定试剂盒与DL2000 DNA marker均购自生工生物工程（上海）股份有限公司。其他常规生化试剂均为国产分析纯。

1.2　*方法*

1.2.1　马铃薯*StIQD20*基因克隆　从NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov）下载马铃薯*StIQD20*基因CDS序列，根据CDS序列设计相应的*StIQD20*基因克隆引物：正向引物（F：5′-ATGGGGAAAAAAGGCAGTTGG-3′），反向引物（R：5′-TCACACAAATCTGTTAAATGGTC-3′）。提取二倍体马铃薯‘C65’的RNA，反转录为cDNA，并以此为模板，PCR扩增*StIQD20*基因的CDS全长序列，通过琼脂糖凝胶电泳实验检测扩增产物条带大小，预期扩增结果为1 608 bp，扩增成功后进行凝胶回收，对回收产物进行测序分析验证结果。

1.2.2　马铃薯*StIQD20*基因过表达载体构建　对pMDC85空载体进行酶切使其线性化，暴露出两个不同的黏性末端，酶切位点分别为*Asc* I与*Pac* I，在T4 DNA连接酶的作用下，将*StIQD20*基因的CDS序列利用双酶切定向克隆法构建至载体pMDC85中，形成重组载体pMDC85-*StIQD20*。将重组载体转入大肠杆菌DH5α后提取质粒，将质粒通过化学转化法导入农杆菌感受态细胞GV3101中，将转化后的菌液均匀地涂布在含卡那霉素的LB固体培养基上，晾干后将其置于28 ℃的恒温培养箱中培养1 d。挑取培养基表面的单菌斑进行PCR验证，确认为阳性菌斑后，摇菌培养并保存菌株，进行测序以及酶切验证。

1.2.3　遗传转化阳性植株鉴定与*StIQD20*基因表达量测定　以生长周期为4周的‘C65’无菌组培苗为植物材料，选取长度约为1 cm且无腋芽的新鲜茎段作为外植体，采用农杆菌介导法进行遗传转化。外植体经过预培养、共培养、愈伤组织诱导及分化培养后，将再生苗转移至含有MS固体培养基及农杆菌抑菌抗生素的生根培养瓶中进行培养。培养3周后，分别采集再生植株及野生型‘C65’的叶片，提取基因组DNA进行PCR扩增与凝胶电泳实验鉴定过表达阳性植株，根据pMDC85的载体序列与*StIQD20*基因的CDS序列设计正向引物*StIQD20*-F（5′-GATCGGACGATTGCGTCGCAT-3′）与反向引物*GFP*-R（5′-CGTGGATATGTCCTGCGGGTAA-3′），扩增长度约1 500 bp。将验证为阳性的再生植株标记为过表达阳性植株，继续继代扩繁培养。分别取野生型植株‘C65’与过表达阳性植株的新鲜叶片进行RNA提取，反转录为cDNA并稀释后，进行RT-qPCR实验测定*StIQD20*基因表达量。引物通过NCBI Primer-BLAST工具设计，分别为*StIQD20*-F与*StIQD20*-R，具体序列详见附表1。以*Actin*基因作为内参基因，采用QuantStudio 6 Flex实时PCR系统进行表达分析。反应体系包括：10 μL TB Green Premix Ex TaqII（Tli RNaseH Plus）（2×）、正向引物0.8 μL、反向引物0.8 μL、稀释后cDNA 2 μL、ROX Reference Dye 0.4 μL与6 μL灭菌水。程序为：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s，60 ℃退火34 s，72 ℃延伸15 s，40个循环，60 ℃复性60 s。以野生型‘C65’为对照，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算基因相对表达量，用SPSS25.0软件做方差齐性检验（levene test），使用Duncan新复级差法分析显著性差异。

1.2.4　盐胁迫处理下表型性状测定与Ca^{2+}表型恢复实验　选取生长约4周的过表达阳性植株与野生型植株无菌组培苗，将每种组培苗分别转接至含不同浓度NaCl（0、50、100、150 mmol/L）的MS固体培养基中，进行继代扩繁培养，30 d后对比观察不同NaCl浓度处理下的植株表型，并对株高、叶片数与鲜重进行测量与统计分析。每组实验设3个生物学重复。使用刻度钢尺测定植株的株高，记录植株的叶片数。随后，用蒸馏水轻轻冲洗去除根部残留的培养基，待晾干后，使用精量天平精确称量植株的鲜重。选取在不同盐胁迫实验中生长指标最优的3种过表达植株与野生型植株进行Ca^{2+}表型恢复实验，在50 mmol/L NaCl浓度的MS固体培养基中进行，在培养基中分别添加不同浓度的$CaCl_2$（50、100 μmol/L），将4类组培苗分别转移至培养基中进行培养，每组实验设置3个生物学重复。30 d后对比观察不同$CaCl_2$

浓度下的各种植株表型。

1.2.5 生理指标与盐胁迫相关基因表达量测定 过表达阳性植株与野生型植株无菌培养25 d后，将其从培养瓶中取出，用清水洗去附着在植株根部的MS固体培养基，分别将过表达植株与野生型植株进行无土栽培培养。以1/2霍格兰（Hoagland）营养液浇灌培养3周后，将不同株系平均分为4组实验处理：1组对照与3组不同的盐胁迫处理（50、100、150 mmol/L NaCl），每组照常设置3个生物学重复。对照组以清水代替营养液，处理组施加相应浓度的NaCl溶液代替营养液。处理2 d后，分别采集不同株系在不同实验处理下的新鲜叶片，立即用液氮速冻，暂存于-80 ℃冰箱中以待后续实验。取保存的叶片材料并使用相应的生理指标检测试剂盒进行实验测定。盐胁迫相关基因表达量的测定选取基因表达量最佳的2种过表达株系与野生型植株进行，取上述100 mmol/L NaCl处理下的3种株系的叶片材料，进行RT-qPCR实验，实验方法同1.2.3，盐胁迫相关基因及其引物具体序列详见附表1。

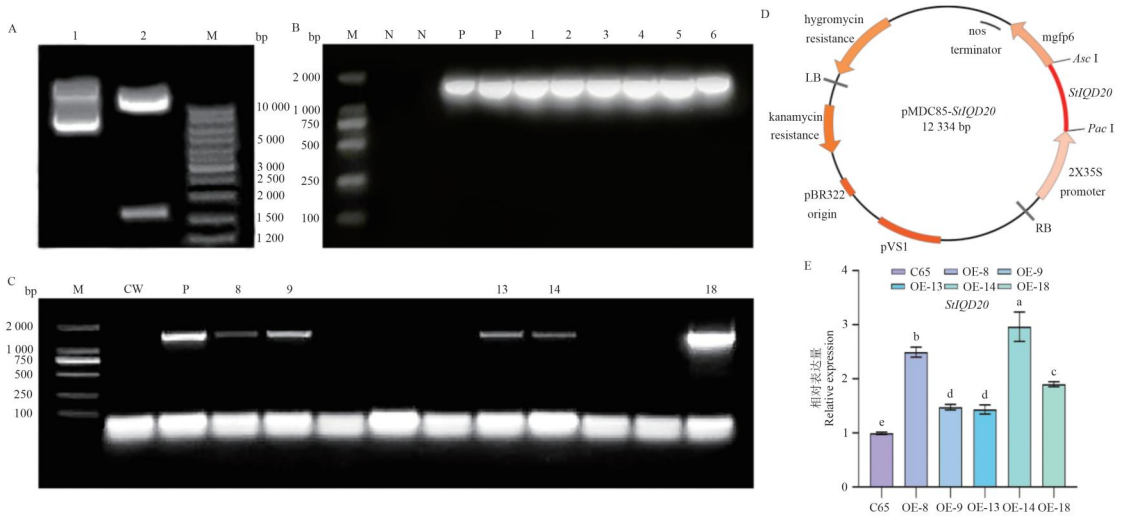
2 结果

2.1 马铃薯*StIQD20*的克隆与过表达载体构建

*StIQD20*基因的PCR产物为单一明亮条带，大小为1 608 bp，与目的基因大小片段一致。将*StIQD20*基因连接到过表达载体pMDC85上，经酶切鉴定及测序比对，确保序列完整无突变（图1-A）。

2.2 *StIQD20*基因的农杆菌转化

将pMDC85-*StIQD20*重组质粒转化至大肠杆菌感受态细胞DH5α中，在含卡那霉素的LB固体培养基中涂板，待菌斑生成后挑取单菌落进行PCR鉴定，鉴定结果如图1-B所示，成功扩增出与目标基因长度相同的条带，初步确定为阳性菌斑，将阳性菌斑进行摇菌，将菌液进行测序，将测序结果正确的菌株保存至-80 ℃冰箱中以备后续使用。



A:1代表含目的基因*StIQD20*的pMDC85质粒;2代表*Asc* I-*Pac* I酶切质粒;M代表10 000 bp DNA marker。B:M代表2 000 bp DNA marker;N代表阴性对照;P代表阳性对照;1–6代表阳性菌斑。C:M代表2 000 bp DNA marker;CW代表野生型;P代表重组载体质粒;8、9、13、14、18代表过表达阳性植株。D:pMDC85-*StIQD20*重组载体图。E:C65代表二倍体野生型植株;OEs代表过表达阳性植株;显著性差异通过Duncan新复极差法确定;不同字母表示差异显著(P<0.05);误差线代表平均值±SD,n=3,下同

A: 1 represents the pMDC85 plasmid containing the target gene *StIQD20*; 2 represents the plasmid digested by Asc I-Pac I; M represents the 10 000 bp DNA marker. B: M represents the 2 000 bp DNA marker; N represents the negative control; P represents the positive control; 1–6 represent the positive colonies. C: M represents the 2 000 bp DNA marker; CW represents the wild type; P represents the recombinant vector plasmid; 8, 9, 13, 14, 18 represent the overexpressing positive plants. D: The recombinant vector map of pMDC85-*StIQD20*. E: C65 represent a diploid wild-type plant. OEs represent the overexpressing positive plants; significant differences among groups were identified using Duncan's new multiple range test; values followed by different lowercase letters are significantly different (P<0.05); error bars in the figures denote average value ± the standard deviation derived from three independent biological replicates, n=3, the same below

图1 马铃薯*StIQD20*过表达载体构建与基因表达分析

Fig. 1 Construction of the overexpression vector of *StIQD20* in potato and analysis of gene expression

2.3　过表达植株鉴定与*StIQD20*基因表达量的测定

提取上述大肠杆菌的质粒并通过化学转化法转化到农杆菌感受态细胞GV3101中，进行农杆菌介导遗传转化实验。图2展示了农杆菌介导遗传转化过程中阳性单克隆菌斑的筛选、愈伤组织的形成过程与再生植株的扩繁培养。最终PCR扩增与凝胶电泳结果如图1-C所示，5棵植株成功扩增出目标长度，并且与阳性对照条带一致，初步确定此5棵植株为过表达阳性植株，并将其标记为不同株系：OE-8、OE-9、OE-13、OE-14、OE-18。

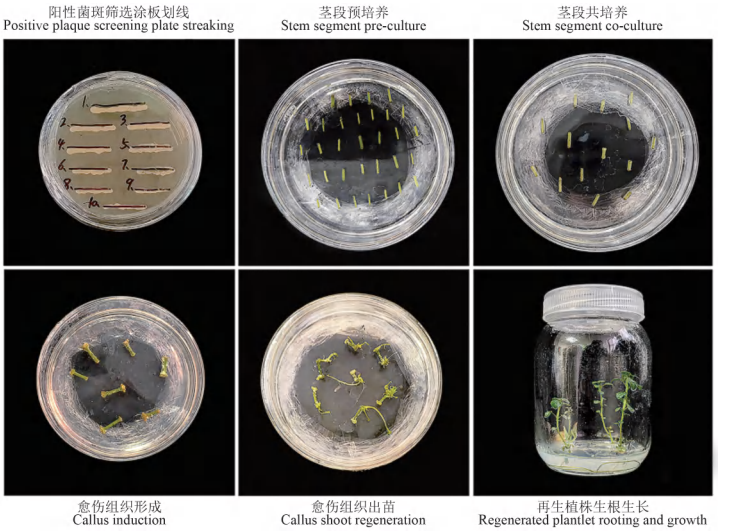


图2　马铃薯*StIQD20*基因过表达阳性植株遗传转化过程

Fig. 2　The genetic transformation process of positive plants overexpressing *StIQD20* gene in potato

RT-qPCR检测*StIQD20*基因表达量结果如图1-E所示，*StIQD20*基因在各过表达阳性植株中的相对表达量均明显高于野生型，OE-8、OE-9、OE-13、OE-14、OE-18相对于野生型‘C65’的*StIQD20*基因表达量分别增高了2.6倍、1.6倍、1.5倍、2.9倍、1.9倍。由此正式确定5棵植株为过表达阳性植株。

2.4　盐胁迫下过表达植株的表型分析

对不同NaCl浓度下过表达阳性植株与野生型植株进行表型观测时，由于在150 mmol/L盐浓度下两类植株均未生根生长而死亡，因此未记录该浓度下的相关数据。如图3所示，在30 d盐胁迫处理后，过表达阳性植株在0、50和100 mmol/L盐浓度中均能生根生长。随着盐浓度的升高，过表达阳性植株与野生型植株的株高、鲜重及叶片数显著降低；且同一NaCl浓度处理下过表达阳性植株的生长指标数值均普遍高于野生型植株，不同类型植株间的差异均达到显著水平。在5棵过表达阳性植株中，不同处理下的生长指标OE-18较野生型最不显著（图4）。此实验结果初步表明*StIQD20*基因的过表达有助于提高植株对盐胁迫的耐受性。

2.5　盐胁迫下外源Ca^{2+}对*StIQD20*过表达株系表型恢复分析

在50 mmol/L盐浓度下，过表达阳性植株表现出优于野生型植株的生长状态（图3–4）。在盐胁迫处理中施加Ca^{2+}的条件下，两种马铃薯幼苗的生长均有明显好转。野生型植株和过表达阳性植株在施加$CaCl_2$处理后，相较于无$CaCl_2$处理的株高均有较大的提升，表明在盐胁迫条件下，适量外源Ca^{2+}的施加能够显著减轻其对马铃薯植株的生长抑制作用。此外，施加100 μmol/L $CaCl_2$处理下相较于施加50 μmol/L $CaCl_2$处理下，高浓度的$CaCl_2$处理对于缓解盐胁迫的作用更加显著（图5）。

2.6　盐胁迫下超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶活性与脯氨酸、丙二醛含量测定

如图6所示，在不同的NaCl浓度处理下，过表达阳性植株的SOD、POD、CAT与PRO数值均高于

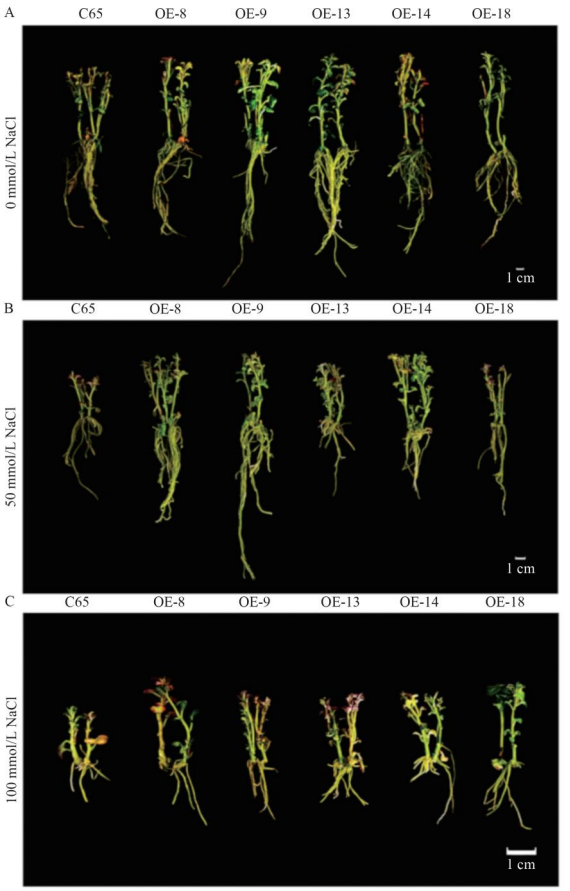


图3 盐胁迫处理30 d后野生型植株与过表达阳性植株表型

Fig. 3 Phenotypes between wild-type plants and overexpressing positive plants after 30 days of salt stress treatment

同等NaCl浓度下的野生型植株，且植株的抗氧化酶活性与PRO含量随NaCl浓度升高呈上升趋势；而过表达阳性植株的MDA含量均低于同等NaCl浓度下的野生型植株，随着NaCl浓度的增加，过表达阳性植株的MDA含量均呈下降趋势，野生型植株呈上升趋势。在图6-A中，随着盐浓度的增加OE-9的SOD酶活性最高。在图6-B中，除OE-18外，其余过表达阳性植株的POD活性均随着NaCl浓度的升高而显著增强。图6-C中，当存在盐胁迫时，OE-13的CAT活性较其余过表达阳性植株更低。以上结果表明，过表达阳性植株能够通过不断增强酶活性与脯氨酸含量，并降低体内MDA含量减小植株受到盐胁迫的损害。

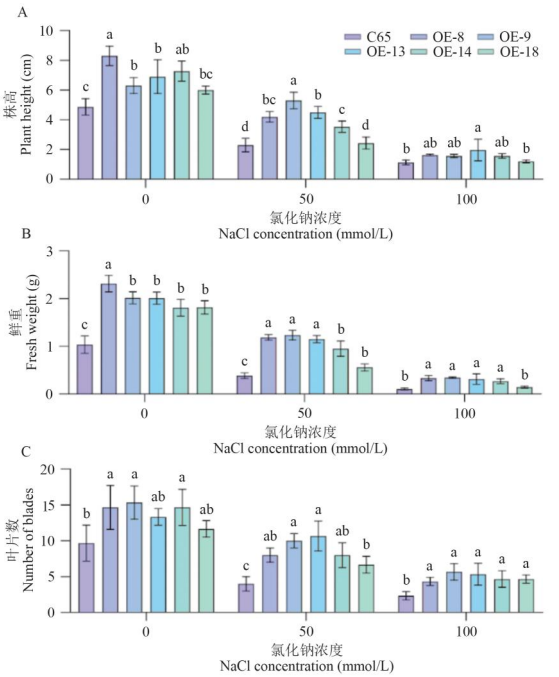


图4 盐胁迫下野生型植株与过表达阳性植株生长指标

Fig. 4 Growth indicators of wild-type plants and overexpressing positive plants under salt stress

2.7 马铃薯相关胁迫响应基因的表达

利用RT-qPCR分析100 mmol/L的盐胁迫处理下过表达阳性植株与野生型植株胁迫响应相关基因的表达量。结果如图7所示，过表达阳性植株的盐胁迫响应基因*SnRK2s*、*ABF4*、*ABI3*、*MYB2*、*DREB2A*的表达水平均显著高于野生型植株；*ABI5*的表达均低于野生型植株。上述结果表明，*StIQD20*基因在马铃薯中可能通过调控多个胁迫相关基因的转录水平，提高植物对盐胁迫的适应能力。

3 讨论

*IQD*基因家族在植物生长发育调控以及非生物胁迫响应中具有重要作用[18]，其在植物盐胁迫响应中扮演着“钙信号解码与细胞形态塑造”的角色；它们并不直接参与离子转运，而是作为Ca^{2+}信号与微管组织之间的桥梁，通过调控下游基因表达和细胞结构来增强植物的耐盐性[19]。

在盐胁迫下，植物体内的Ca^{2+}信号能够诱导ABA快速积累，从而促进保卫细胞内阴离子及K^+外排，同时抑制K^+的内流。这一过程最终促使气孔关

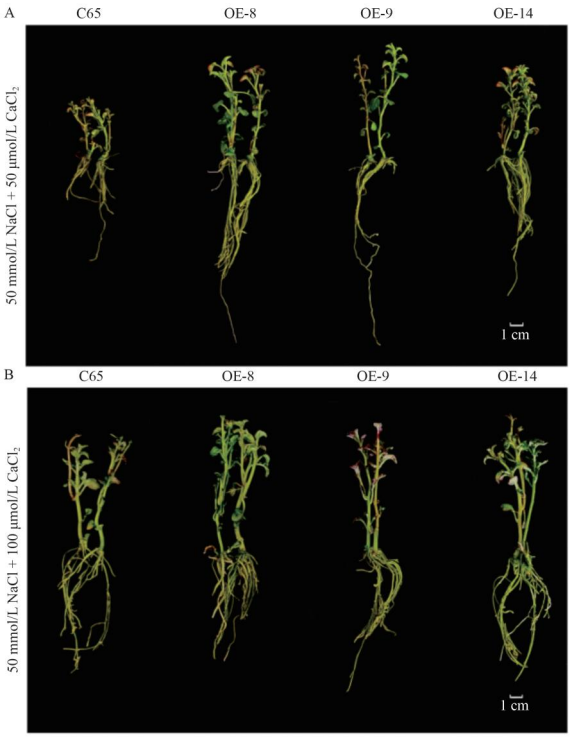


图5　不同$CaCl_2$浓度对盐胁迫下马铃薯幼苗生长发育的影响

Fig. 5　Effects of different $CaCl_2$ concentrations on the growth and development of potato seedlings under salt stress

闭，减少因蒸腾作用导致的水分流失，从而提升植物的耐盐能力[20]。在盐胁迫下，Ca^{2+}还能够与水杨酸共同作用，有效减少组织中MDA和H_2O_2的含量，保护植物免受氧化损伤[21]。本研究成功筛选得到5个*StIQD20*过表达阳性株系，RT-qPCR实验检测过表达阳性植株中*StIQD20*基因的表达水平显著高于野生型。且在盐胁迫下表型分析表明，过表达株系的株高、鲜重与叶片数在50、100 mmol/L NaCl处理下均显著优于野生型植株。这直接证明了过表达*StIQD20*能够有效增强马铃薯植株对盐胁迫的耐受性，促进其在逆境下的生物量积累。

在生理生化方面，过表达株系表现出更强的抗氧化和渗透调节能力。在不同浓度盐胁迫实验处理下，过表达植株的抗氧化酶活性（SOD、POD、CAT）以及渗透调节物质脯氨酸（PRO）的含量显著高于野生型，丙二醛（MDA）含量在过表达植株中显著降低。这些结果表明，*StIQD20*基因过表达可能通过增强活性氧清除系统与维持细胞渗透平衡，减轻盐胁迫对细胞膜系统的氧化损伤，从而维持细胞的正常生理功能。此外，外源Ca^{2+}处理可缓解盐胁迫对植株生长的抑制，且100 μmol/L浓度的效果优于50 μmol/L。这与前人研究结果相符：盐胁迫条件下，植物细胞质中游离Ca^{2+}浓度升高，Ca^{2+}与钙调蛋白（CaM）结合，进而在胁迫响应中发挥重要作用[22]。结合IQD蛋白作为钙调素结合蛋白的特性，我们推测StIQD20可能通过感知和传递钙离子信号，参与调控下游的耐盐应答通路。钙信号是重要的第二信使，在植物逆境信号转导中发挥核心作用，StIQD20可能作为其

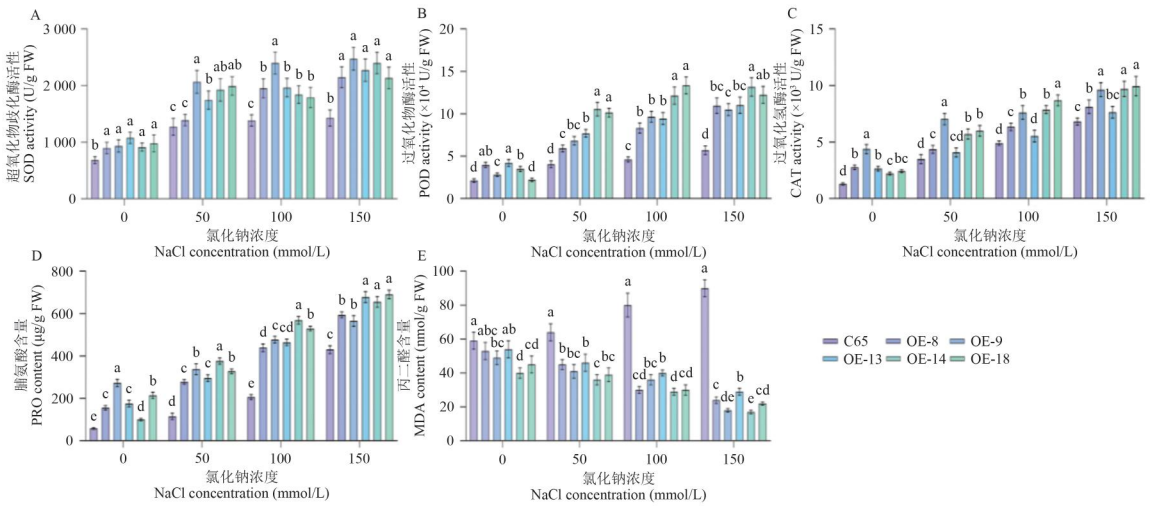


图6　不同氯化钠浓度下植株中抗氧化指标的变化

Fig. 6　Changes in antioxidant indicators in plants under different NaCl concentrations

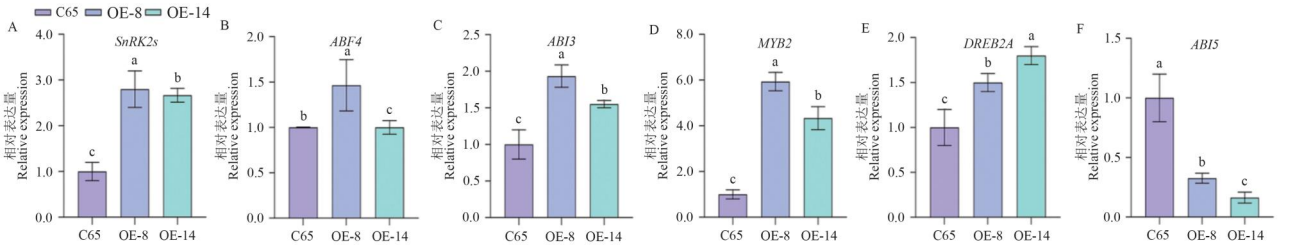


图7 过表达*StIQD20*阳性植株中盐胁迫相关基因的表达量分析

Fig. 7 Analysis of the expression levels of salt stress-related genes in *StIQD20*-overexpressing positive plants

中的关键节点，连接盐胁迫触发的钙信号与下游防御反应[23]。

RT-qPCR结果显示，盐胁迫处理后*SnRK2s*、*ABF4*、*ABI3*、*MYB2*和*DREB2A*等胁迫响应基因的表达均上调。这些基因从功能层面共同构成了多层次、高效的胁迫防御系统。相关研究表明，*SnRK2s*和*ABF4*的上调可增强ABA胁迫信号，*MYB2*和*DREB2A*的上调可以确保渗透压和氧化应激等伤害得到有效应对，这种基因协同性是植物增强耐盐性的经典途径[24-25]。ABI5是ABA信号通路下游的一个转录抑制因子，能够直接结合并抑制一系列生长促进基因的启动子，解除植物生长阻滞[26]。这些生长促进基因大多与细胞伸长、分裂以及光合作用相关[27]，此外，ABI5的磷酸化通常影响其活性与稳定性，一些基因可通过结合ABI5的Ser-145（*SnRK2s*的磷酸化位点）来降低其磷酸化活性和稳定性[28]。ABI3与ABI5互作可增强后者的转录激活功能[29]，如BR信号通路中的BES1可通过结合ABI5来阻止其与ABI3的互作，从而抑制ABI5活性[30-31]。StIQD20作为“盐胁迫→钙信号→ABA响应”这一通路中的关键节点，可能同样会通过促进ABI5蛋白的泛素化降解或阻碍ABI5的转录激活复合物形成等途径来抑制ABI5的转录激活功能。

本研究以野生型二倍体马铃薯‘C65’为材料，克隆*StIQD20*基因，构建过表达载体，并筛选得到阳性植株。RT-qPCR检测表明，过表达阳性植株中*StIQD20*的表达量显著高于野生型。在相同盐胁迫条件下，外源钙离子的处理能显著缓解盐胁迫对马铃薯植株的损伤。研究*StIQD20*基因的功能，将有助于进一步揭示Ca^{2+}/CaM信号转导在植物生长发育和细胞生理过程中的调控机制。

4 结论

*StIQD20*基因编码蛋白作用于钙信号转导通路的下游环节，可能作为钙信号与盐胁迫响应转录网络间的桥梁。主要通过正向调控*SnRK2s*、*ABF4*等保护性基因，同时下调转录抑制因子*ABI5*的表达，在激活抗氧化、渗透调节等多重生理防御的同时，缓解生长抑制，实现了生长与防御的再平衡。

文章所有附图附表请点击链接查看（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260506104140_NewsFile_96.pdf）

参考文献

[1] Chele KH, Tinte MM, Piater LA, et al. Soil salinity, a serious environmental issue and plant responses: a metabolomics perspective [J]. Metabolites, 2021, 11(11): 724.

[2] 刘国永, 周雪雁, 蒋才富, 等. 植物耐盐碱胁迫分子机制研究进展: 从模式植物到玉米 [J]. 科学通报, 2025, 70(25): 4272-4287.
Liu GY, Zhou XY, Jiang CF, et al. Molecular mechanisms underlying plant adaptation to saline-alkaline stress: from model systems to *Zea mays* [J]. Chin Sci Bull, 2025, 70(25): 4272-4287.

[3] 田京江, 井大炜, 朱炎辉, 等. 我国马铃薯耐盐性研究进展 [J]. 安徽农学通报, 2018, 24(8): 38-39, 44.
Tian JJ, Jing DW, Zhu YH, et al. Research progress on salt tolerance of potato in China [J]. Anhui Agric Sci Bull, 2018, 24(8): 38-39, 44.

[4] 胡钰婕, 吴玺, 王证德, 等. 盐碱胁迫对马铃薯生理生态特性的影响研究进展 [J]. 热带农业科学, 2022, 42(12): 80-85.
Hu YJ, Wu X, Wang ZD, et al. Research progress on effects of saline alkali stress on physiological and ecological characteristics of potato [J]. Chin J Trop Agric, 2022, 42(12): 80-85.

[5] Li Q, Qin YZ, Hu XX, et al. Physiology and gene expression analysis of potato (*Solanum tuberosum* L.) in salt stress [J]. Plants, 2022, 11(12): 1565.

[6] 殷秀霞, 陈芹芹, 刘海双, 等. 钙信号在植物响应盐胁迫中的作

用研究进展 [J]. 分子植物育种, 2023, 21(3): 850-857.
Yin XX, Chen QQ, Liu HS, et al. Research progress in the role of calcium signaling in plant response to salt stress [J]. Mol Plant Breed, 2023, 21(3): 850-857.

[7] 陈娇娆, 续旭, 胡章立, 等. 植物感受盐胁迫及相关钙信号的研究进展 [J]. 植物研究, 2022, 42(4): 713-720.
Chen JR, Xu X, Hu ZL, et al. Recent advances on salt stress sensitivity and related calcium signals in plants [J]. Bull Bot Res, 2022, 42(4): 713-720.

[8] Abel S, Bürstenbinder K, Müller J. The emerging function of IQD proteins as scaffolds in cellular signaling and trafficking [J]. Plant Signal Behav, 2013, 8(6): e24369.

[9] Yang X, Kirungu JN, Magwanga RO, et al. Knockdown of *GhIQD31* and *GhIQD32* increases drought and salt stress sensitivity in *Gossypium hirsutum* [J]. Plant Physiol Biochem, 2019, 144: 166-177.

[10] 练珊珊, 张宝会, 姚新转, 等. 茶树 *CsIQD* 基因家族的鉴定和表达模式分析 [J]. 特产研究, 2021, 43(5): 26-34.
Lian SS, Zhang BH, Yao XZ, et al. Identification and expression pattern analysis of *CsIQD* gene family in *Camellia sinensis* L [J]. Spec Wild Econ Anim Plant Res, 2021, 43(5): 26-34.

[11] Kumar M, Kesawat MS, Ali A, et al. Integration of abscisic acid signaling with other signaling pathways in plant stress responses and development [J]. Plants, 2019, 8(12): 592.

[12] Kamiyama Y, Katagiri S, Umezawa T. Growth promotion or osmotic stress response: how SNF1-related protein kinase 2 (SnRK2) kinases are activated and manage intracellular signaling in plants [J]. Plants, 2021, 10(7): 1443.

[13] Al-Sawa'eer AS, Al-Samydai A, Odeh L, et al. Early plant development as a systems-level trait: integrating omics, artificial intelligence, and emerging biotechnologies [J]. Plants, 2026, 15 (5): 787.

[14] Chang HC, Tsai MC, Wu SS, et al. Regulation of ABI5 expression by ABF3 during salt stress responses in *Arabidopsis thaliana* [J]. Bot Stud, 2019, 60: 16.

[15] Tang RY, Yang JJ, Han X, et al. Evening complex proteins antagonize ABI3 and ABI5 to temporally regulate abscisic acid signaling and seed germination [J]. Plant Cell, 2025, 37(8): koaf189.

[16] Wang XP, Niu YL, Zheng Y. Multiple functions of MYB transcription factors in abiotic stress responses [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(11): 6125.

[17] Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, et al. Organization and expression of two *Arabidopsis DREB2* genes encoding *DRE*-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression [J]. Plant Mol Biol, 2000, 42(4): 657-665.

[18] 柯清林. 小麦IQ67-domain基因家族的全基因组鉴定、表达分析及进化研究 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2022.
Ke QL. Genome-wide identification, expression analysis and evolutionary relationships of the IQ67-domain gene family in common wheat (*Triticum aestivum* L.) [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2022.

[19] 崔之瀚, 魏庆镇, 胡娜, 等. 园艺作物 *IQD* 基因研究进展 [J]. 生物技术通报, 2026, 42(3): 230-241.
Cui ZH, Wei QZ, Hu N, et al. Research progress of *IQD* gene in horticultural crops [J]. Biotechnol Bull, 2026, 42(3): 230-241.

[20] Cheung WY. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation [J]. Science, 1980, 207(4426): 19-27.

[21] Methenni K, Ben Abdallah M, Nouairi I, et al. Salicylic acid and calcium pretreatments alleviate the toxic effect of salinity in the Oueslati olive variety [J]. Sci Hortic, 2018, 233: 349-358.

[22] Liu S, Zhao LY, Cheng MZ, et al. Calmodulins and calmodulin-like proteins-mediated plant organellar calcium signaling networks under abiotic stress [J]. Crop J, 2024, 12(5): 1321-1332.

[23] 尹倩倩, 李明, 丁博, 等. 植物钙调素结合蛋白IQD的研究概况 [J]. 分子植物育种, 2016, 14(11): 3224-3231.
Yin QQ, Li M, Ding B, et al. Research advances on plant calmodulin binding protein IQD [J]. Mol Plant Breed, 2016, 14(11): 3224-3231.

[24] Yoshida T, Mogami J, Yamaguchi-Shinozaki K. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants [J]. Curr Opin Plant Biol, 2014, 21: 133-139.

[25] Fang SM, Hou X, Liang XL. Response mechanisms of plants under saline-alkali stress [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 667458.

[26] Zhao HY, Zhang YM, Zheng Y. Integration of ABA, GA, and light signaling in seed germination through the regulation of ABI5 [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 1000803.

[27] Yang C, Li XB, Chen SQ, et al. ABI5-FLZ13 module transcriptionally represses growth-related genes to delay seed germination in response to ABA [J]. Plant Commun, 2023, 4(6): 100636.

[28] Zheng XN, Mo WL, Zuo ZC, et al. From regulation to application: the role of abscisic acid in seed and fruit development and agronomic production strategies [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(22): 12024.

[29] Lopez-Molina L, Mongrand S, McLachlin DT, et al. ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination [J]. Plant J, 2002, 32(3): 317-328.

[30] Zhao X, Dou LR, Gong ZZ, et al. BES1 hinders ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 and promotes seed germination in *Arabidopsis* [J]. New Phytol, 2019, 221(2): 908-918.

[31] Sirko A, Wawrzyńska A, Brzywczy J, et al. Control of ABA signaling and crosstalk with other hormones by the selective degradation of pathway components [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4638.

（责任编辑　张婷婷）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):216-228

九种金丝桃属植物叶绿体全基因组:基因组结构、比较分析和系统发育关系

范照睿[1#] 王佳敏[2#] 童凯[1*] 康振辉[1*]
(1.四川轻化工大学食品与酿酒工程学院,宜宾 644000; 2.兰州大学生态学院,兰州 730000)

摘 要: 【目的】分析川滇金丝桃(*Hypericum forrestii*)在内的金丝桃属物种叶绿体基因组结构、基因组成及系统发育关系,为物种鉴定和进化研究提供基因组学基础。【方法】采用高通量测序技术对川滇金丝桃叶绿体基因组进行测序与组装,并结合NCBI数据库获取的8种金丝桃属已发表叶绿体基因组数据,共计9个物种开展比较基因组学分析。利用相关生物信息学工具对叶绿体基因组进行基因注释,并进一步开展简单重复序列(SSR)分析、密码子使用偏好分析、IR边界结构比较以及核苷酸多样性分析,同时基于完整叶绿体基因组序列构建系统发育树。【结果】对9种金丝桃属植物的叶绿体基因组进行分析,结果表明,所有物种的基因组结构均呈典型的四分体环状结构,基因数在110-130个之间,符合已报道的金丝桃属叶绿体基因组特征。基因组长度范围为122 570-168 150 bp,GC含量为37.04%-38.14%。SSR分析表明,单核苷酸重复类型占主导,且以A/T碱基为主。密码子使用分析表明,A/U结尾的密码子使用偏好性明显。核苷酸多样性分析显示,LSC和SSC区域为主要的变异热点,尤其是*trnH-psbA*、*rpoC2-rpoC1*、*ndhF-rpl32*等基因间区。系统发育分析表明,金丝桃属为单系群,支持与川苔草科的亲缘关系。【结论】9种金丝桃属植物叶绿体基因组均呈典型四分体结构,IR区的动态变化是导致基因组长度差异的主要因素,LSC和SSC区的高变异热点区域可作为潜在的分子标记。系统发育分析支持金丝桃属为单系群,并与川苔草科具有较近亲缘关系。

关键词: 川滇金丝桃;叶绿体基因组;系统发育分析;比较基因组学;简单重复序列(SSR);核苷酸多样性;IR边界
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1253

Chloroplast Whole Genomes of Nine *Hypericum* Species: Genome Structure, Comparative Analysis, and Phylogenetic Relationships

FAN Zhao-rui[1#] WANG Jia-min[2#] TONG Kai[1*] KANG Zhen-hui[1*]
(1. *School of Food and Brewing Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Yibin* 644000; 2. *College of Ecology, Lanzhou University, Lanzhou* 730000)

Abstract: 【Objective】This study aimed to analyze the chloroplast genome structure, gene composition, and phylogenetic relationships of *Hypericum forrestii* and related *Hypericum* species, providing a genomic foundation for species identification and evolutionary research. 【Method】The chloroplast genome of *H. forrestii* was sequenced and assembled using high-throughput sequencing technology. Together with sequences of eight published *Hypericum* species retrieved from the NCBI database, a total of nine chloroplast genomes were analyzed. Comparative genomic analyses were performed, including genome annotation, simple sequence repeat (SSR) identification, codon usage bias analysis, inverted repeat (IR) boundary comparison, nucleotide diversity analysis, and phylogenetic reconstruction based on complete chloroplast genome sequences. 【Result】The chloroplast genomes of the nine *Hypericum* species exhibited a typical quadripartite circular structure, with gene numbers ranging from 110 to 130, consistent with previously reported features in the genus. Genome sizes ranged from 122 570 to 168 150 bp, with GC content of 37.04%-38.14%. SSR analysis showed that single nucleotide repeat were dominant, and

收稿日期: 2025-11-19
基金项目: 国家自然科学基金项目(31601291),四川省科技计划重点项目(2020YFN0023)
*通信作者: 康振辉 zhkang85@126.com,童凯 a1149762188@gmail.com
#同等贡献

mononucleotide A/T repeats were the most abundant repeat type. Codon usage analysis showed a clear preference for A/U-ending codons. Nucleotide diversity analysis indicated that the LSC and SSC regions were the primary variation hotspots, particularly the intergenic spacers *trnH-psbA*, *rpoC2-rpoC1*, and *ndhF-rpl32*. Phylogenetic analysis supported the monophyly of *Hypericum* and its close relationship with Podostemaceae.【Conclusion】 The chloroplast genomes of nine *Hypericum* species all exhibit a typical quadripartite structure. Dynamic changes in the IR regions are the main mechanism responsible for genome size variation, while highly variable hotspots in the LSC and SSC regions serve as promising molecular markers. Phylogenetic analysis supports the monophyly of *Hypericum* and its close relationship with Podostemaceae.

Keywords: *Hypericum forrestii*; chloroplast genome; phylogenetic analysis; comparative genomics; simple sequence repeats (SSRs); nucleotide diversity; IR boundary

金丝桃属（*Hypericum*）是金丝桃科中最大的属之一，约包含500个物种，主要分布于欧亚大陆和南美安第斯山区[1]。许多金丝桃属植物具有重要的药用价值，例如贯叶连翘（*H. perforatum*），又名圣约翰草，作为著名的传统草药，被广泛用于治疗轻、中度抑郁症和抗炎症治疗等[2-3]。川滇金丝桃（*H. forrestii*）作为金丝桃属中中国西南高山特有物种，具有潜在抗抑郁和抗氧化药用价值，且此前未有完整叶绿体基因组报道。鉴于该属物种多样性及其重要的药用和生态价值，基于基因组的系统研究对于明确物种界限、揭示亲缘关系和开发药用资源的分子标记具有重要意义。

叶绿体基因组在结构和基因含量上通常较为保守，呈现典型的四元循环结构，包含1个大单拷贝区（large single-copy region, LSC）、1个小单拷贝区（small single-copy region, SSC）和2段倒位重复区（inverted repeat, IR），基因组大小一般在120–160 kb之间[4]。与核基因组和线粒体基因组相比，叶绿体基因组的基因组组成、结构及基因数目相对稳定，因此常被用作植物系统发育研究的分子标记。

在叶绿体基因组比较研究中，简单序列重复（SSR）和其他长重复序列常被用作遗传标记和进化研究的工具。先前对金丝桃属和相关植物的研究表明，叶绿体SSR多集中在LSC区，以单核苷酸重复为主[5]。此外，密码子使用偏好可以反映基因组的演化特征。研究发现*Hypericum*叶绿体编码区偏好使用以A或U（DNA上对应A/T）结尾的密码子。叶绿体基因组的大小变化往往与IR区边界的扩张或收缩密切相关，被认为是基因组大小差异的主要机制。此外，叶绿体基因组长度的物种间差异主要由倒位重复区（IR）边界的扩张或收缩造成，IR的动态变化会导致基因拷贝数和边界邻近基因（如*rps19*、*ycf1*等）位置的重排或丧失，因此比较IR边界为解析基因组结构演化提供了直接证据[6]。近年来的方法学进展（例如IR检测与可视化工具）也使得对这些边界事件的定量比较更为可靠。比较基因组学和滑动窗口分析在多个*Hypericum*和相关研究中反复识别出若干高变热点区域，这些高变区可作为潜在的DNA条码或群体遗传学标记，便于物种鉴定与群体水平研究的开展[7]。叶绿体基因组的系统发育研究或许可为*Hypericum*属域内支系划分提供更高分辨率的依据，正如近期有研究表明通过增加物种样本量更能支持科内的部族关系与属内近缘关系的划分，而仅利用核基因组数据检验叶绿体与核基因组间的核质冲突与基因渐渗时可能存在谱系不一致或杂交信号[8-9]。

本研究以9种金丝桃属植物为对象（其中*H. forrestii*为首次测序物种），结合前人公开的叶绿体基因组数据，对其基因组结构特征进行系统比较分析。利用高通量测序技术对*H. forrestii*的叶绿体基因组进行组装与注释，分析叶绿体基因组中SSR分布和其他长重复序列特征，研究基因组的密码子使用偏好及IR区边界的扩张/收缩情况，并开展多序列比对和系统发育分析，以揭示物种间的亲缘关系。本研究旨在通过揭示金丝桃属叶绿体基因组的结构多样性及物种间演化关系，为金丝桃属物种的鉴定和保护提供新的分子标记和演化信息。

1　材料与方法

1.1　材料

川滇金丝桃（*H. forrestii*）的新鲜叶片采自四川省乐山市（29°32′N，103°21′E）。凭证标本（编号：ghao220810）保存于峨眉山标本馆。植物标本的采

集符合《中华人民共和国野生植物保护条例》的相关规定。总基因组DNA采用改良CTAB法提取[10]。基因组测序由中国甘肃紫沐生物科技有限公司在Illumina HiSeq平台上完成，产生约5.77 Gb原始数据。此外，从NCBI数据库下载其余8种金丝桃属物种（*H. acmosepalum*、*H. addingtonii*、*H. ascyron*、*H. beanii*、*H. monogynum*、*H. perforatum*、*H. petiolulatum*和*H. sampsonii*）的完整叶绿体基因组序列，用于后续比较分析。

1.2 方法

1.2.1 叶绿体基因组组装与注释 原始测序数据经Trimmomatic v0.36进行质量控制[11]，使用默认参数。修剪后的高质量读段采用SPAdes v3.14.1进行组装[12]。组装结果通过CPGAVAS2进行基因注释[13]，并在Notepad++及Geneious软件中进行人工校正[14]，以获得最终注释文件。环状叶绿体基因组图谱通过OGDRAW（http://ogdraw.mpimp-golm.mpg.de）生成，采用默认参数，以确定倒置重复（IR）区与大单拷贝（LSC）、小单拷贝（SSC）区的相对位置[15]。

1.2.2 简单重复序列与分散重复序列分析 使用MISA分析9种金丝桃属植物叶绿体基因组中的简单重复序列（SSR）[16]，确定SSR的类型、数量与分布位置。分析参数设置如下：单核苷酸重复≥10，二核苷酸≥6，三至六核苷酸均≥5，SSR之间的最大间距为100 bp。长重复序列（包括回文、正向、反向及互补重复）通过REPuter检测，参数设定为Hamming距离3，最小重复长度30 bp[17]。

1.2.3 密码子使用情况分析 利用cpstools（https://github.com/Xwb7533/CPStools）从GenBank文件中提取9种金丝桃属植物的CDS序列，去除重复项并筛除长度小于300 bp及非ATG起始的序列[18]。使用RSCUcaller（https://github.com/Mordziarz/RSCUcaller）计算相对同义密码子使用率（relative synonymous codon usage, RSCU）、密码子组统计及氨基酸组成特征，并对结果进行可视化分析[19]。

1.2.4 基因组比较与结构分析 通过IRscope（https://irscope.shinyapps.io/irapp/）生成IR边界比较图[20]，分析不同物种间4个边界区域（LSC-IRa、IRa-SSC、SSC-IRb、IRb-LSC）及其相邻基因的相对位置变化，从而探讨金丝桃属叶绿体基因组结构演化特征。使用mVISTA（https://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml）在Shuffle-LAGAN模式下对叶绿体基因组进行全局比对，其他参数为默认设置，用以检测基因重排与倒位现象[21]。

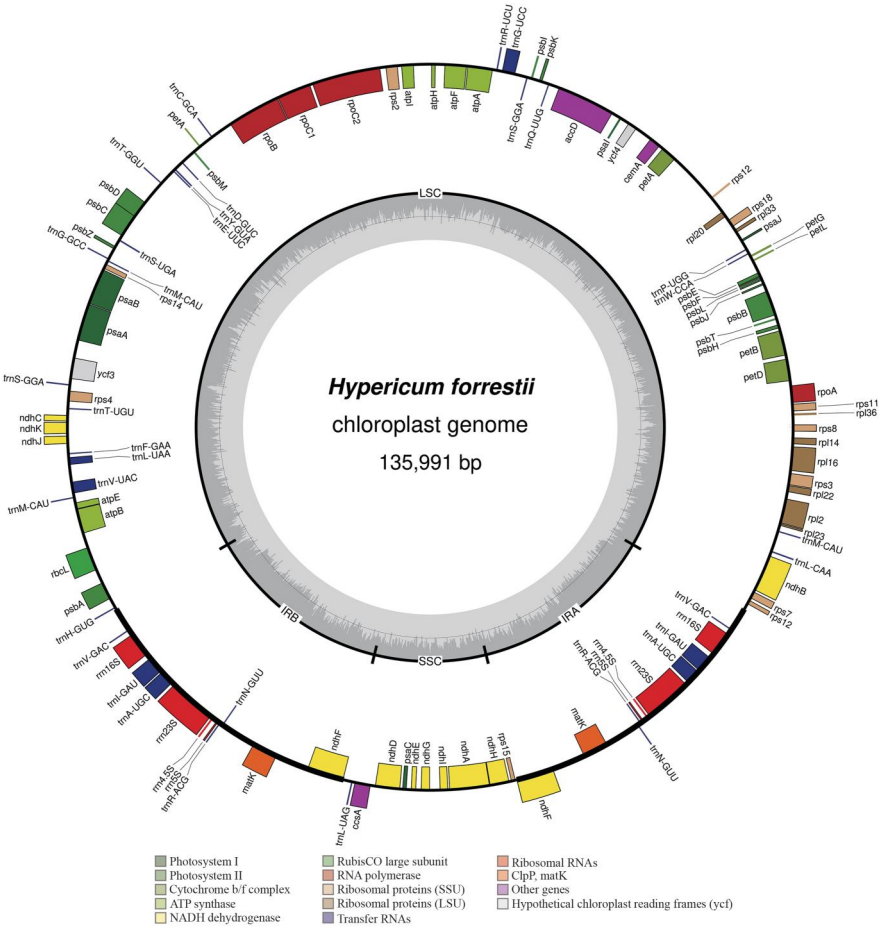
1.2.5 系统发育与核苷酸多态性分析 利用PhyloSuite v1.2.3从9种金丝桃属植物及外群物种的叶绿体基因组中提取48个共有蛋白编码基因（PCGs）[22]。序列经MAFFT v7.4比对并拼接[23]，随后使用Gblocks v0.91b提取保守区段[24]。最大似然（ML）系统发育树通过IQ-TREE v2.1.2构建，模型由ModelFinder自动选择（GTR+F+I+G4），并进行5 000次超快速自举验证[25]。系统发育树在iTOL平台（https://itol.embl.de/）进行可视化与美化[26]。核苷酸多态性分析使用DnaSP v6.12完成，并将结果绘制为折线图以展示变异分布特征[27]。

2 结果

2.1 金丝桃属物种叶绿体基因组的一般特征

9种*Hypericum*属植物的完整叶绿体基因组均呈典型的四分体环状结构（附表1），包含大单拷贝区（LSC）、小单拷贝区（SSC）和1对反向重复区（IR）（图1，附图1）。基因组长度范围为122 570–168 150 bp。其中*H. forrestii*的基因组总长度为135 991 bp，由LSC区（90 710 bp）、SSC区（10 425 bp）和2段IR区（各34 856 bp）组成。主要由于SSC区和IR区的缩短，*H. sampsonii*和*H. ascyron*的基因组较长（168 150 bp和162 286 bp），主要归因于IR区扩增。*H. forrestii*的基因组总长度为135 991 bp，由LSC区（90 710 bp）、SSC区（10 425 bp）和2段IR区（各34 856 bp）组成。各物种整体GC含量变化较小，为37.04%–38.14%，但IR区GC含量相对较高或波动较大，与该区域富含rRNA基因及重复序列有关。整体GC含量在9个物种中变化较小，为37.04%–38.14%。在不同功能区中，GC含量分布存在一定差异，LSC区和SSC区相对较低，而IR区普遍较高或波动较大。

注释结果显示（附表2），*H. forrestii*叶绿体基因组共鉴定115个基因，其中包括73个蛋白编码基因（PCG）、34个tRNA基因和8个rRNA基因。部分基因在IR区中发生重复，且存在顺式剪接和反式剪接基因，表明其基因结构具有一定复杂性（附图2）。



图中展示了4个基因组区域(大单拷贝区LSC、小单拷贝区SSC、反向重复区IRA和反向重复区IRB)。圆内的基因顺时针转录,圆外的基因逆时针转录。不同功能类别的基因用不同颜色标记。内圈显示GC含量(深灰色)和AT含量(浅灰色)

The figure shows four genomic regions: the Large Single-Copy region (LSC), the Small Single-Copy region (SSC), and the two Inverted Repeat regions (IRA and IRB). Genes located inside the circle are transcribed clockwise, while those outside are transcribed counter clockwise. Genes belonging to different functional categories are marked in different colors. The inner circle indicates the GC content (dark gray) and AT content (light gray)

图1　川滇金丝桃叶绿体基因组图谱

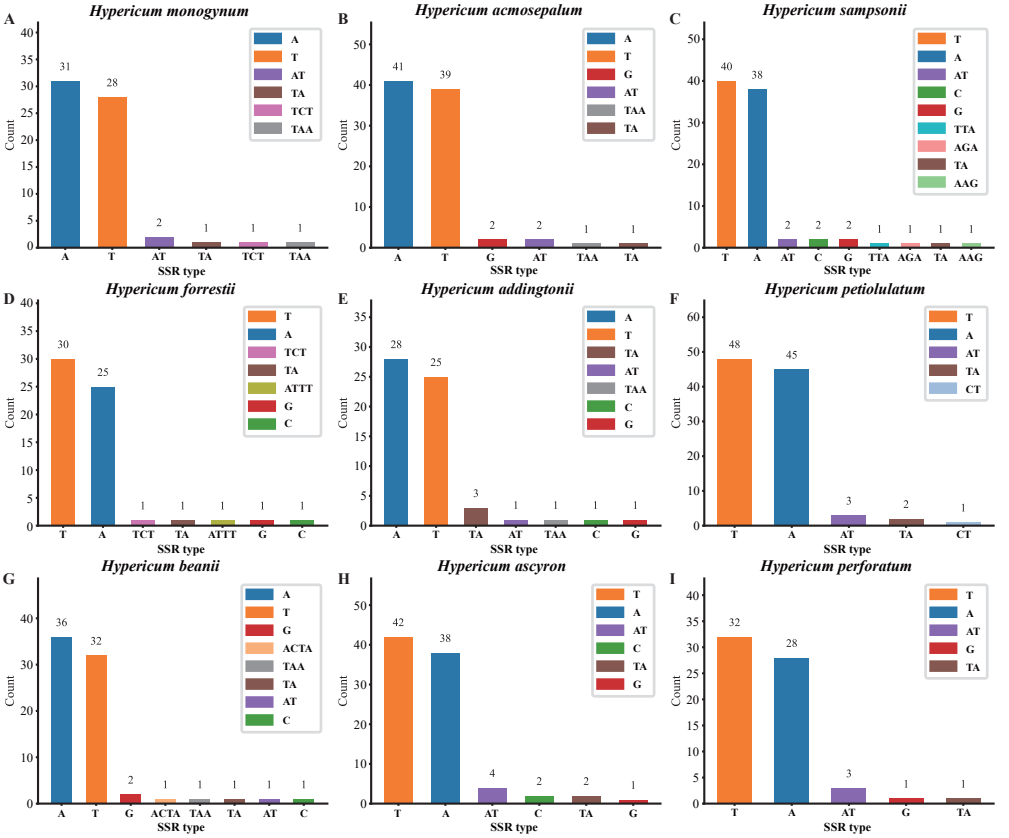
Fig. 1　Chloroplast genome map of *Hypericum forrestii*

从9个物种的整体比较结果来看，基因数在112–127个之间，蛋白编码基因为72–86个，tRNA为29–37个，rRNA为6–8个。这些基因主要参与光合作用、自我复制及蛋白合成等功能，显示出较高的保守性。

2.2　九种金丝桃属物种叶绿体基因组中的重复序列

针对9种基因组的SSR分析显示，在所有样品中均检测到单核苷酸、二核苷酸及少量三核苷酸的简单重复序列，主要分布在LSC区，其中单核苷酸重复为主要类型且数量显著高于其他类型（图2，图3，附表3）。A/T型单核苷酸重复在所有物种中最为丰富，体现出显著的A/T偏好性。SSR总数在物种间存在差异，*H. petiolulatum*的SSR数量最高，A与T单核分别达到48和45个；*H. addingtonii*和*H. monogynum*的SSR数量相对较少（约60个左右）。二核与三核类型（例如AT、TA、TAA、TCT等）普遍较少，占总体SSR的比例小，三核及以上的重复则较为罕见。

SSR长度主要集中在10–15 bp，其中10–12 bp最为常见，占总SSR的大部分比例，显示出较高的种间变异性。高变异基因间区（如*trnH-psbA*、*ndhF-*



A–I: 在不同重复类型中识别出的SSR基序的频率

A–I: Frequency of SSR motifs identified in different repeat types

图2 9种金丝桃属植物叶绿体基因组的SSR位点分析

Fig. 2 Analysis of SSR loci in the chloroplast genomes of nine *Hypericum* species

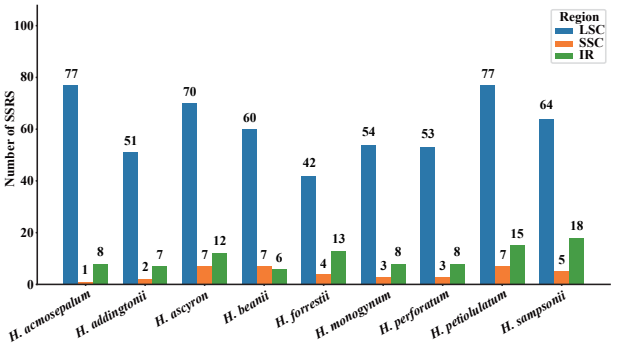
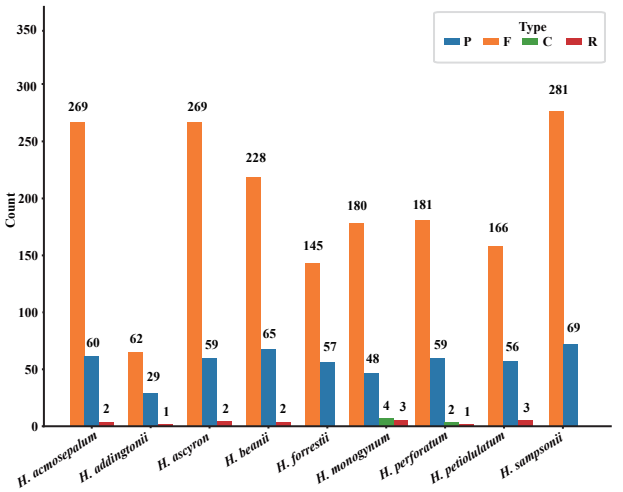


图3 SSR位点在LSC、SSC和IR区域内的重复类型频率

Fig. 3 Frequency of SSR repeat types in the LSC, SSC, and IR regions

rpl32）SSR长度和密度的差异尤为明显，提示其具有较高的遗传分辨力，可作为潜在的分子标记资源（附表4）。

对9种金丝桃属植物叶绿体基因组中散在重复序列进行计数，共鉴定出2 303对重复序列（图4和附表5），具体为：14对反向重复序列（R），502对回文重复序列（P），1 781对正向重复序列（F），6对互补重复序列（C）。重复序列长度主要集中在30–49 bp，短重复（30–39 bp）最为丰富，而较长重复（>49 bp）相对稀少，但在*H. sampsonii*等物种中仍有明显积累。重复序列主要分布于基因间区，少数嵌入蛋白编码基因，如*ycf2*、*rps16*等。不同物种在重复序列的数量、类型及长度分布上存在差异，这可能反映了叶绿体基因组在演化过程中不同物种的结构多样性和物种特异性特征。总体而言，SSR与散在重复序列的分布模式不仅揭示了基因组保守性与变异热点，也为未来*Hypericum*属的系统发育研究和分子标记开发提供了重要信息。



图中蓝色条状P代表回文重复序列,橙色条状F代表正重复序列,绿色条状C代表互补重复序列,红色条状R代表反向重复序列

The blue bars labeled P represent palindromic repeats, the orange bars labeled F represent forward repeats, the green bars labeled C represent complementary repeats, and the red bars labeled R represent reverse repeats

图4　9种金丝桃属植物的长重复序列数和类型

Fig. 4　Number and types of long repeat sequences in nine *Hypericum* species

2.3　密码子使用偏好

对9种金丝桃属物种蛋白编码基因进行相对同义密码子使用率（RSCU）分析，结果显示所有样本均使用64个密码子，编码19种氨基酸。Leu、Arg与Ser的密码子类型最多，均为6个，Met与Trp各由1个密码子编码。各物种的RSCU柱状图整体分布趋势相似。多数密码子的RSCU值在0.5–1.5之间（图5-A），表明金丝桃属植物叶绿体基因组中密码子使用较为稳定。其中，以A或U结尾的密码子偏好性明显高于以G或C结尾的类型，如UUA（编码Leu）、AUA（编码Ile）、GAA（编码Glu）及AAA（编码Lys）等的RSCU值均显著高于1.0，显示出显著的A/U偏好性。相反，G/C结尾的密码子（如CCG、GGC、CGC等）RSCU值均低于1.0，使用频率相对较低。

热图进一步揭示了9种金丝桃属植物间的密码子使用差异（图5-B）。颜色变化反映了RSCU值的高低，其中蓝色表示高频密码子（RSCU>1），红色表示低频密码子（RSCU<1）。值得注意的是，亮氨酸的密码子TTA在所有物种中具有最高的RSCU值（约2.0），而同样编码亮氨酸的CTG的RSCU值最低（约0.3），表明金丝桃属植物对以A/U结尾的亮氨酸密码子具有显著偏好。少数物种间差异如*H. petiolulatum*和*H. ascyron*中部分A/U结尾的密码子偏好略强，而*H. monogynum*与*H. addingtonii*在少数G/C结尾的密码子上呈现相对均衡的使用倾向。

总体而言，金丝桃属叶绿体基因组的密码子使用模式高度保守，存在显著的A/U偏好，与大多数被子植物叶绿体基因组一致，同时显示出物种间有限的种内变异。

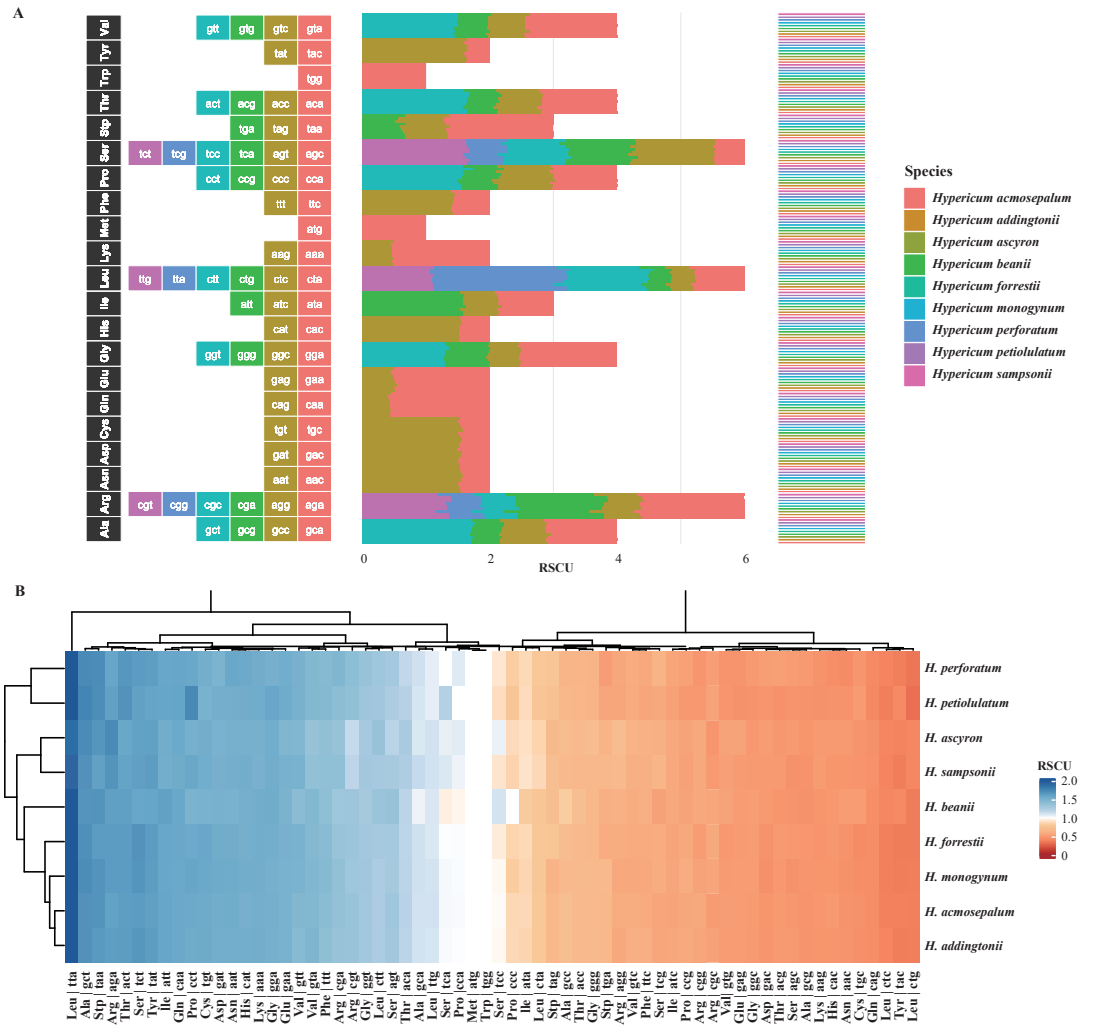
2.4　IR区的扩展与收缩

在对9种金丝桃属物种的叶绿体基因组比较中，比较了4个叶绿体边界区域，即LSC-IRb交界（JLB）、SSC-IRb交界（JSB）、SSC-IRa交界（JSA）和LSC-IRa交界（JLA），发现LSC-IRb边界普遍不与基因重叠（图6），仅*H. addingtonii*的LSC-IRb边界与*rrn5*基因相距25 bp。*H. ascyron*、*H. forrestii*、*H. perforatum*和*H. petiolulatum*的IRb-SSC边界均距*ndhF*基因26 bp；而在*H. addingtonii*中，IRb-SSC边界与*rrn16*基因相距17 bp。相比之下，其余金丝桃属物种在该边界处缺失*ndhF*。在SSC-IRa边界上，*H. ascyron*、*H. forrestii*与*H. monogynum*的*ndhF*基因均跨越该边界11 bp；*H. addingtonii*的*rrn16*基因跨越该边界16 bp；而*H. perforatum*与*H. petiolulatum*的*ndhF*基因则较近，均距该边界25 bp。

2.5　叶绿体基因组序列比较与核苷酸多样性

基于mVISTA的全局比对（Shuffle-LAGAN）显示，9种叶绿体基因组在结构与基因顺序上高度保守（图7），蛋白编码区（exon）和rRNA/tRNA区域的序列同源性较高，非编码区（CNS）出现较多波动与显著的低同源片段，是叶绿体基因组中主要的变异热点。且IR区比单拷贝区更为保守。比对结果揭示若干高变异热点，在*rpoC2-rpoC1*、*psaA-ycf3*、*ndhF-ccsA*等区域曲线下降明显，提示这些基因间区为金丝桃属叶绿体中较高变异区域。

核苷酸多样性（π）滑动窗口分析结果表明，9种金丝桃属植物叶绿体基因组整体变异水平较低（π≈0.000 5–0.002 5）（图8），表明该属植物的叶绿体基因组在种间层面上高度保守，变异主要集中在一些特定的非编码区或特定基因区段，例如*trnH-*



A:9种金丝桃属植物不同密码子RSCU柱状图;B:9种金丝桃属植物RSCU值的热图

A: Bar chart of RSCU for different codons across nine *Hypericum* species. B: Heatmap of RSCU values for nine *Hypericum* species

图5 金丝桃属植物的相对同义密码子使用度(RSCU)

Fig. 5 Relative synonymous codon usage (RSCU) in *Hypericum* species

psbA、*rpoC2-rpoC1*、*ndhF-rpl32*和*ycf1*等区域，这些区域的π值峰值明显，进一步确认了它们是潜在的变异热点。这些高变异区域通常位于LSC和SSC区域，而IR区则呈现出较低的变异性，符合被子植物叶绿体基因组的普遍规律，即IR区的序列通常高度保守。

在9种金丝桃属叶绿体基因组中，存在高变异的基因，如*ndhF*（π>0.005，间隔区变异高）、*rpoC2*（转录相关）和*ycf1*（假设蛋白，边界变异）。此外，存在PAV（presence-absence variation）变异显著的基因：tRNA基因数量在29–37个之间波动，*ndhF*在部分种（如*H. addingtonii*）中缺失或伪基因化，*ycf1*拷贝数变异源于IR扩张。这些快速进化的基因与特定功能相关：*ndhF*参与光合电子传递和抗逆应激，*rpoC2*调控叶绿体转录表达，*ycf1*涉及膜蛋白稳定性和蛋白导入，可能帮助植物适应高山或干旱环境。金丝桃属中的这些高变基因与其他植物已报道的叶绿体快速进化基因高度一致，例如在*Prunus*属中*ycf1-ndhF*为常见热点，在*Panax*属中*rpoC2*显示高变异率，在*ndh*家族中PAV变异普遍存在，进一步支持这些区域作为跨属分子标记的潜力。鉴于这些变异热点区域的高核苷酸多样性，它们具有作为分子

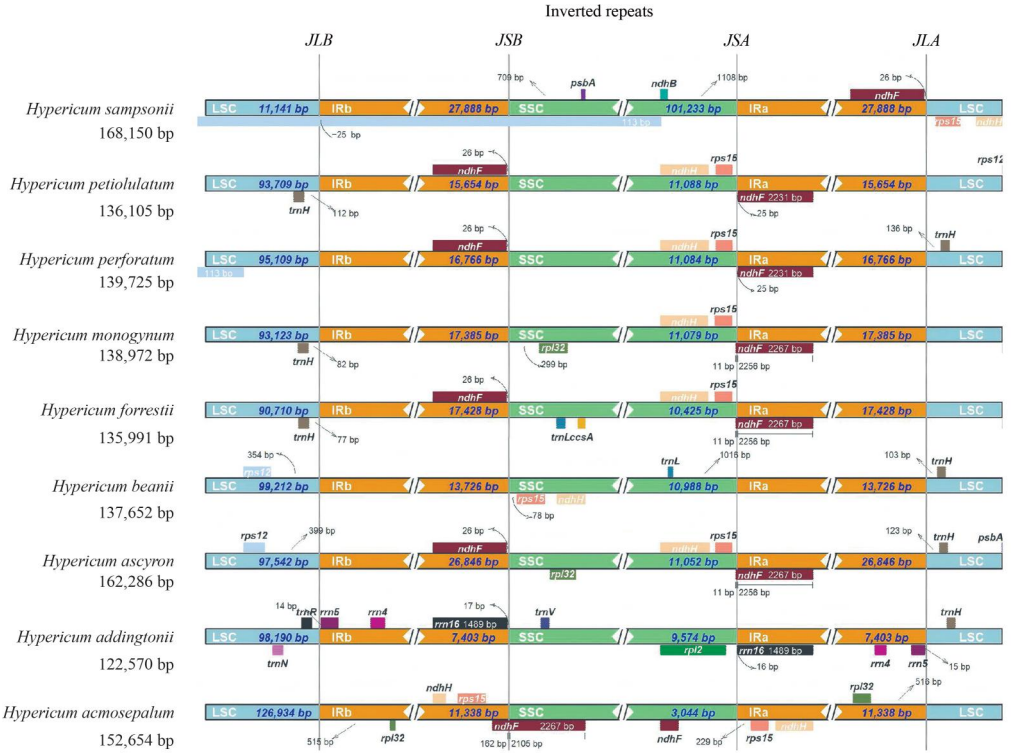


图6　9种金丝桃属叶绿体基因组中LSC、SSC和IR区域边界的比较

Fig. 6　Comparison of the boundaries of LSC, SSC, and IR regions in the chloroplast genomes of nine *Hypericum* species

标记的潜力，可以用于开发叶绿体DNA条形码或高分辨率的系统发育标记，进而在金丝桃属物种间进行细致的种间区分或类群辨识。

2.6　系统发育分析

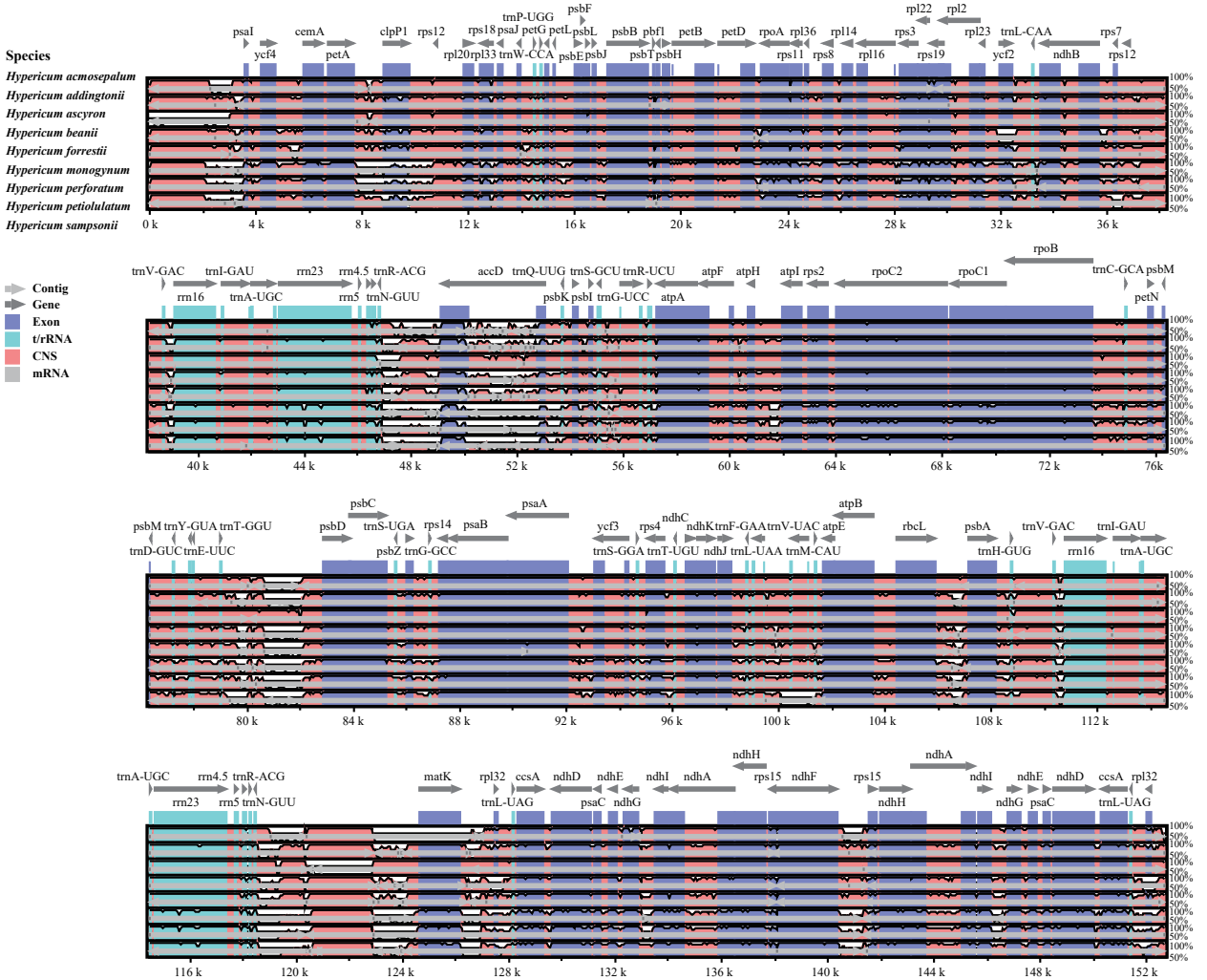
为了推断金丝桃科植物各物种与金虎尾目其他科之间的系统发育关系，基于48个共有蛋白编码基因（PCGs）构建最大似然树（图9）。生成的拓扑结构具有一致的系统发育关系且分辨率较高，其中金丝桃科（Hypericaceae）和Podostemaceae科形成一个紧密的进化枝，支持度极高（BS=100%和PP=1.00），而这一分支进一步与Calophyllaceae科聚类，具有强烈的统计支持（BS=100%和PP=1.00）。相比之下，这一簇与Clusiaceae科的亲缘关系较远，后者独立形成一个分支，支持度为100%。

在金丝桃科内部，该科分为2个主要进化枝——Cratoxyleae族和Hypericeae族，支持度很高（BS=100%）。Cratoxyleae族包含多个*Cratoxylum*种，包括*C. arborescens*、*C. cochinchinense*、*C. formosum*、*C. maingayi*和*C. sumatranum*，其中*C. arborescens*作为该族最早分化出的物种，具有高支持度（BS=100%），其余物种依次分化，形成一个单系群，分支长度较短表明遗传变异较低。

在*Hypericum*属内部，9种植物形成一个进化枝，其中*H. petiolatum*作为第一个分化出的物种，支持度为100%，随后是*H. perforatum*和*H. ascyron*的分化（支持度100%），*H. addingtonii*、*H. acmosepalum*、*H. beanii*形成子簇，其中*H. acmosepalum*和*H. beanii*亲缘最近（支持度100%），它们与*H. addingtonii*共享祖先（支持度100%），*H. forrestii*则与*H. monogynum*亲缘关系最为接近。

3　讨论

九种金丝桃属植物的叶绿体基因组均呈典型的四分体结构，包含大单拷贝区（LSC）、小单拷贝区（SSC）以及2对反向重复区（IR）。这一结构与大多数被子植物的叶绿体基因组一致，表明金丝桃属植物在叶绿体基因组的进化上保持了较高的保守性[28]。整体GC含量较为一致，表明其核苷酸组成



x轴代表核苷酸序列，y轴代表序列同源性百分比，范围50%–100%。曲线下方突出显示了保守区域，红色区域为“保守非编码序列”（CNS），深蓝色区域为外显子，浅蓝色区域为tRNA或rRNA

The x-axis represents the nucleotide sequence, and the y-axis represents the sequence homology percentage, ranging from 50% to 100%. Conserved regions are highlighted below the curve, with red indicating “Conserved Noncoding Sequences” (CNS), dark blue indicating exons, and light blue indicating tRNA or rRNA

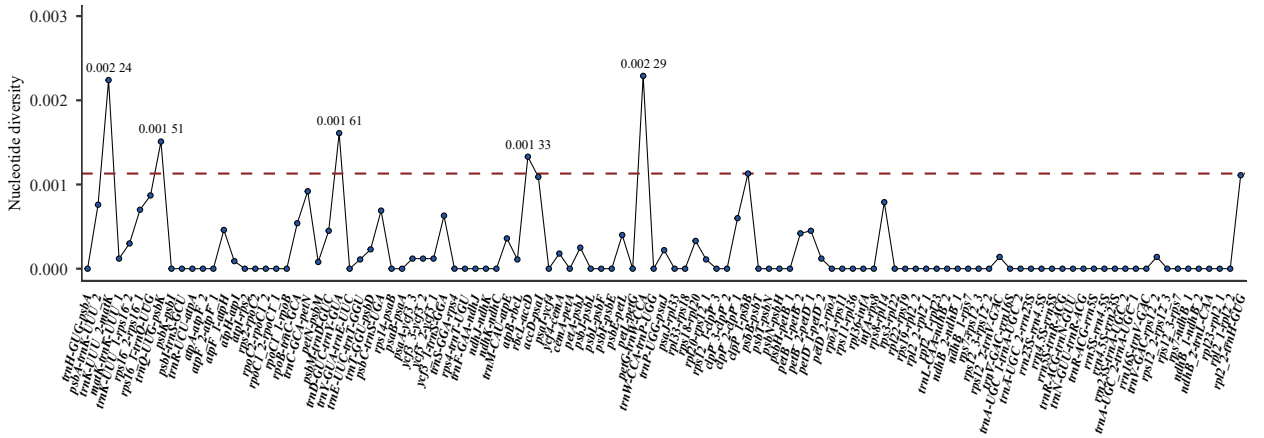
图7 9种金丝桃属叶绿体基因组序列特征比较图谱

Fig. 7 Comparative map of sequence features of the chloroplast genomes of nine *Hypericum* species

在进化过程中保持相对稳定。尽管如此，IR区GC含量较高或波动较大的现象值得注意，这可能与富含rRNA基因及重复序列的区域特点有关[29]。与若干近缘研究比较，本研究样本覆盖更多种间差异，能够更全面地反映金丝桃属叶绿体基因组的整体特征及种间差异。

简单序列重复分析结果表明，单核苷酸重复（尤其是A/T类型）在9种金丝桃属物种中普遍存在，且在LSC区的分布最为集中。A/T的偏好性与大多数被子植物相似，这表明金丝桃属植物叶绿体基因组在重复序列的类型和分布上与其他植物相似[30]。通过分析重复序列的种类和数量，发现正向重复和回文重复占主导地位，以30–39 bp的短重复最为丰富，且大多数位于基因间区，理论上，这些特征可能促进局部重组或微小结构变动，影响基因组稳定性与IR边界演化[31]。

在密码子使用上，本研究观察到金丝桃属植物叶绿体基因组存在显著的A/U偏好性，这一现象在



x轴：窗口中点的位置；y轴：每个窗口的核苷酸多样性；红色虚线代表9种植物叶绿体基因组的平均核苷酸多样性水平

x-axis: midpoint position of each window; y-axis: nucleotide diversity of each window. The red dashed line represents the average nucleotide diversity across the complete chloroplast genomes of the nine *Hypericum* species

图8　9种金丝桃属植物的全叶绿体基因组滑动窗口分析

Fig. 8　Sliding window analysis of the complete chloroplast genomes of nine *Hypericum* species

所有物种中普遍存在。Leu、Arg与Ser的密码子类型最多，且A/U结尾的密码子使用频率显著高于G/C结尾的密码子，这种偏好性与其他被子植物的叶绿体基因组一致。这表明金丝桃属植物在叶绿体基因组的进化过程中保持了较为一致的密码子使用模式，但在不同物种之间仍存在微小的差异[32]，反映了轻微的选择性或突变偏向差异。

通过对叶绿体基因组的核苷酸多样性（π）滑动窗口分析，发现9种金丝桃属植物的叶绿体基因组在整体上显示出较低的多样性（π≈0.000 5–0.002 5），表明这些基因组在种间层面上保持了较高的保守性。然而，分析也揭示了一些高变异区域，特别是在*trnH-psbA*、*rpoC2-rpoC1*、*ndhF-rpl32*和*ycf1*等基因区段。这些区域使其成为潜在的分子标记，可用于物种鉴定和系统发育研究。与IR区域相比，LSC和SSC区域的变异性较高，符合被子植物叶绿体基因组普遍规律，即IR区域通常更加保守[33]。

通过基于106个叶绿体基因构建的最大似然（ML）系统发育树显示，*Hypericaceae*与*Podostemaceae*亲缘关系密切，在*Hypericum*属内形成单系进化枝，其中*H. petiolulatum*为最早分化物种，*H. forrestii*与*H. monogynum*亲缘关系较近，为该属系统发育提供了重要分子证据。

尽管叶绿体基因组在解析属内系统关系和识别高变区方面具有重要价值，但其单一遗传系统的局限性（如母系遗传和较低的有效群体大小）可能削弱对物种边界及复杂杂交历史的解析能力。因此，未来研究应结合核基因组SNP、全基因组测序或目标捕获数据等多组学信息进行综合分析，以更全面地揭示金丝桃属植物的系统发育格局与演化历史[34]。近年来，随着高通量测序和比较基因组学技术的快速发展，叶绿体基因组在植物系统发育、群体遗传和物种鉴定等领域的应用愈加广泛。本研究揭示了叶绿体基因组结构特征、重复序列分布及高变区段，为进一步探讨该属的系统演化与遗传多样性奠定了基础。未来可进一步整合叶绿体与核基因组信息（如genome skimming或target-capture技术），以检测属内潜在的杂交、基因渗流及叶绿体捕获事件，从而提升物种界限与演化历史的解析精度[35–36]。同时，应针对本研究中识别的高变区段设计特异性引物，并在更大样本与更广地理分布范围内进行验证，以评估其作为DNA条码或群体标记的实用性与稳定性[37]。此外，在关键样本中采用长读或混合组装策略，将有助于解析IR边界、重复序列及复杂结构区域；结合*dN/dS*或位点选择性分析方法，对高变基因的功能演化与适应性分化进行探讨[38–39]。通过这些多层次的研究策略，不仅可进一步完善金丝桃属系统发育与演化研究框架，还

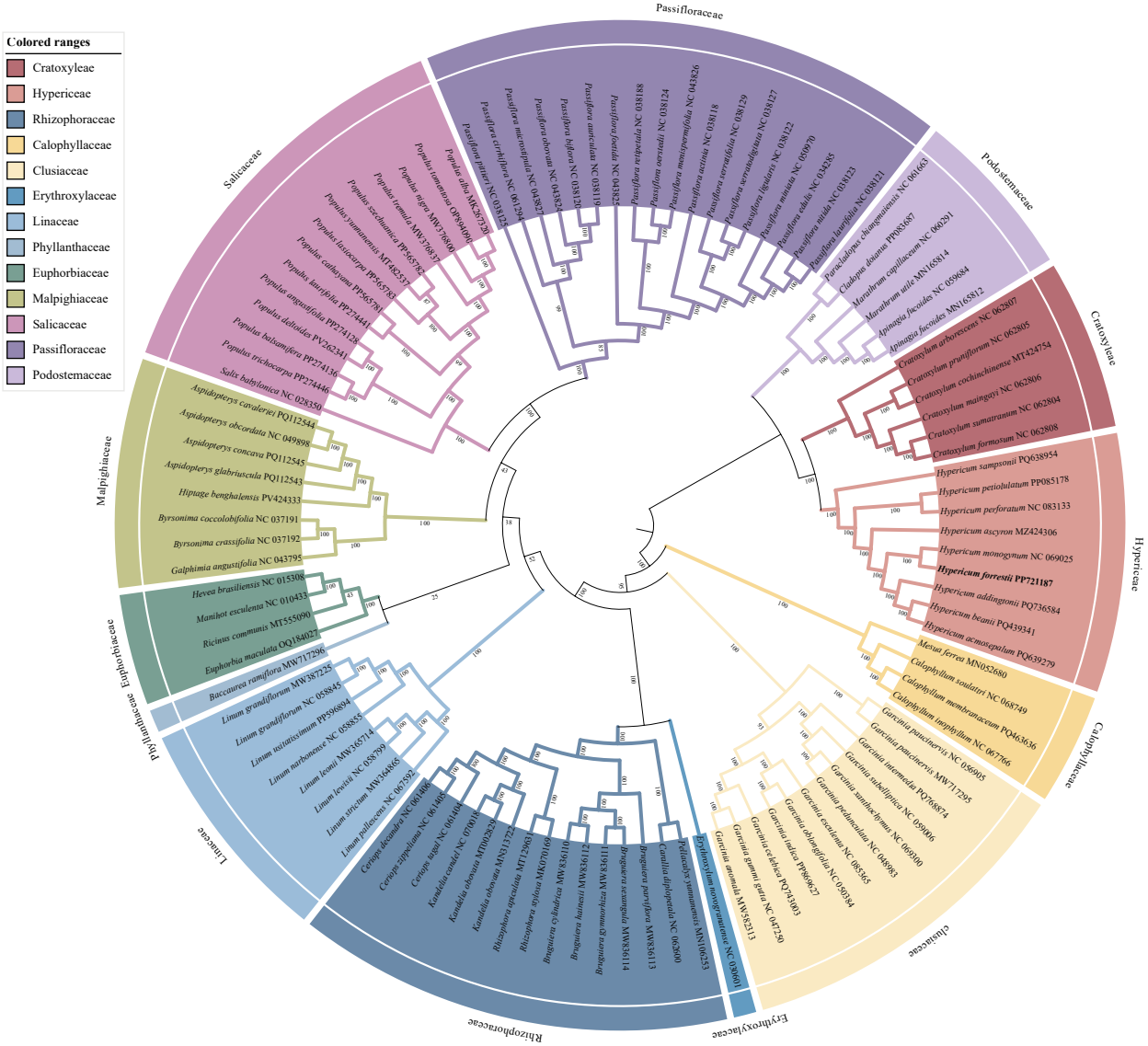


图9 基于最大似然法(ML)构建的金虎尾目植物叶绿体基因组系统发育树

Fig. 9 Maximum likelihood phylogenetic tree of Malpighiales based on chloroplast genomes

能为该属药用资源的开发与遗传多样性保护提供坚实的分子基础。

4 结论

九种金丝桃属植物叶绿体基因组均为四分体结构，基因组长度122 570–168 150 bp，其差异主要与IR区扩张或收缩及SSC区长度变化有关。各物种整体GC含量和基因组成较稳定。SSR以A/T单核苷酸重复为主，密码子使用呈明显A/U偏好。核苷酸多样性分析表明LSC和SSC为主要变异区域，*trnH-psbA*、*rpoC2-rpoC1*等为高变区。系统发育分析支持金丝桃属为单系群，并与Podostemaceae关系较近。

文章所有附图附表请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260509173108_NewsFile_25.pdf）。

参考文献

[1] Kladar N, Božin B, Bijelić K, et al. Biological activity of genus *Hypericum* Sect. *Hypericum* species——*H. Tetrapterum*, *H.*

maculatum subsp. *immaculatum*, *H. triquetrifolium* [J]. Molecules, 2023, 28(17): 6218.

[2] Apaydin EA, Maher AR, Shanman R, et al. A systematic review of St. John's wort for major depressive disorder [J]. Syst Rev, 2016, 5: 148.

[3] Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties [J]. J Pharm Pharmacol, 2001, 53(5): 583-600.

[4] Yan K, Lu X, Li WD, et al. Chloroplast genome diversity and molecular evolution in Hypericaceae: new insights from three *Hypericum* species [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(1): 323.

[5] Khade YP, Mainkar P, Chandanshive A, et al. Harnessing chloroplast SSRs to decipher genetic diversity in underutilized *Allium* species [J]. Front Plant Sci, 2025, 16: 1645145.

[6] Plunkett GM, Downie SR. Expansion and contraction of the chloroplast inverted repeat in Apiaceae subfamily apioideae [J]. Syst Bot, 2000, 25(4): 648.

[7] Dong WP, Liu J, Yu J, et al. Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35071.

[8] Cai LM, Xi ZX, Lemmon EM, et al. The perfect storm: gene tree estimation error, incomplete lineage sorting, and ancient gene flow explain the most recalcitrant ancient angiosperm clade, malpighiales [J]. Syst Biol, 2021, 70(3): 491-507.

[9] Tokuoka T, Tobe H. Phylogenetic analyses of Malpighiales using plastid and nuclear DNA sequences, with particular reference to the embryology of Euphorbiaceae Sens. str [J]. J Plant Res, 2006, 119(6): 599-616.

[10] Pahlich E, Gerlitz C. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochemistry, 1980, 19: 11-13.

[11] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120.

[12] Bankevich A, Gurevich AA, Dvorkin M, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing [J]. J Comput Biol, 2012, 19(5): 455-477.

[13] Shi LC, Chen HM, Jiang M, et al. CPGAVAS2, an integrated plastome sequence annotator and analyzer [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W65-W73.

[14] Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data [J]. Bioinformatics, 2012, 28(12): 1647-1649.

[15] Lohse M, Drechsel O, Kahlau S, et al. OrganellarGenomeDRAW—a suite of tools for generating physical maps of plastid and mitochondrial genomes and visualizing expression data sets [J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(W1): W575-W581.

[16] Beier S, Thiel T, Münch T, et al. MISA-web: a web server for microsatellite prediction [J]. Bioinformatics, 2017, 33(16): 2583-2585.

[17] Kurtz S. REPuter: the manifold applications of repeat analysis on a genomic scale [J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(22): 4633-4642.

[18] Huang LJ, Yu HX, Wang Z, et al. CPStools: a package for analyzing chloroplast genome sequences [J]. iMetaOmics, 2024, 1(2): e25.

[19] Maździarz M, Zając S, Paukszto Ł, et al. RSCUcaller: an R package for analyzing differences in relative synonymous codon usage (RSCU) [J]. BMC Bioinform, 2025, 26: 141.

[20] Amiryousefi A, Hyvönen J, Poczai P. IRscope: an online program to visualize the junction sites of chloroplast genomes [J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): 3030-3031.

[21] Frazer KA, Pachter L, Poliakov A, et al. VISTA: computational tools for comparative genomics [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32: W273-W279.

[22] Zhang D, Gao FL, Jakovlić I, et al. PhyloSuite: an integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies [J]. Mol Ecol Resour, 2020, 20(1): 348-355.

[23] Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability [J]. Mol Biol Evol, 2013, 30(4): 772-780.

[24] Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis [J]. Mol Biol Evol, 2000, 17(4): 540-552.

[25] Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, et al. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies [J]. Mol Biol Evol, 2015, 32(1): 268-274.

[26] Letunic I, Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool [J]. Nucleic Acids Res, 2024, 52(W1): W78-W82.

[27] Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets [J]. Mol Biol Evol, 2017, 34(12): 3299-3302.

[28] Cauz-Santos LA. Beyond conservation: the landscape of chloroplast genome rearrangements in angiosperms [J]. New Phytol, 2025, 247(6): 2571-2580.

[29] Fu N, Ji MY, Rouard M, et al. Comparative plastome analysis of Musaceae and new insights into phylogenetic relationships [J]. BMC Genom, 2022, 23: 223.

[30] Shen LW, Chen SQ, Liang M, et al. Comparative analysis of codon usage bias in chloroplast genomes of ten medicinal species of Rutaceae [J]. BMC Plant Biol, 2024, 24(1): 424.

[31] Dekhkonov D, Asatulloev T, Yusupov Z, et al. Comparative chloroplast genome and phylogenetic analysis of Central Asian

tulips [J]. Nord J Bot, 2025, 2025(7): e04460.

[32] Li JX, Du Y, Xie L, et al. Comparative plastome genomics and phylogenetic relationships of the genus *Trollius* [J]. Front Plant Sci, 2023, 14: 1293091.

[33] Meena RK, Negi N, Uniyal N, et al. Chloroplast-based DNA barcode analysis indicates high discriminatory potential of matK locus in Himalayan temperate bamboos [J]. 3 Biotech, 2020, 10 (12): 534.

[34] Fan YJ, Li CG, Ma C, et al. Holistic approach for plant species circumscription integrating standard barcodes, chloroplast genomes, single-copy nuclear genes and micro-morphological data: a case study in *Epimedium* (Berberidaceae) [J]. BMC Genom, 2025, 26: 931.

[35] Andermann T, Torres Jiménez MF, Matos-Maraví P, et al. A guide to carrying out a phylogenomic target sequence capture project [J]. Front Genet, 2020, 10: 1407.

[36] Trevisan B, Alcantara DMC, Machado DJ, et al. Genome skimming is a low-cost and robust strategy to assemble complete mitochondrial genomes from ethanol preserved specimens in biodiversity studies [J]. PeerJ, 2019, 7: e7543.

[37] Antil S, Abraham JS, Sripoorna S, et al. DNA barcoding, an effective tool for species identification: a review [J]. Mol Biol Rep, 2023, 50(1): 761-775.

[38] Wang WW, Schalamun M, Morales-Suarez A, et al. Assembly of chloroplast genomes with long- and short-read data: a comparison of approaches using *Eucalyptus pauciflora* as a test case [J]. BMC Genom, 2018, 19: 977.

[39] Wu H, Li DZ, Ma PF. Unprecedented variation pattern of plastid genomes and the potential role in adaptive evolution in Poales [J]. BMC Biol, 2024, 22: 97.

（责任编辑　高洁）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):229-237

杂交兰*ChChlH*基因的克隆及其表达分析

林榕燕 孔兰 吴建设 林兵 钟淮钦*
（福建省农业科学院作物研究所(福建省种质资源中心）福建省特色花卉工程技术研究中心,福州 350013）

摘 要： 【目的】克隆获得杂交兰镁螯合酶H亚基基因（*ChlH*），并对其表达水平和功能进行分析，为探究*ChlH*基因在杂交兰叶色变异中的调控作用提供重要依据。【方法】利用RT-PCR和RACE技术从杂交兰叶片中克隆获得*ChChlH*基因序列，对其进行生物信息学分析；利用基因组步移法获得*ChChlH*基因启动子序列，分析其顺式作用元件；利用RT-qPCR法分析*ChChlH*在不同组织及不同品种叶片中的表达情况；基于VIGS技术验证沉默*ChChlH*基因对烟草叶色变化的影响。【结果】*ChChlH*基因全长4 321 bp，编码区长4 155 bp，GenBank登录号为OL741687.1，编码1 384个氨基酸；ChChlH蛋白可能是一种亲水性不稳定蛋白质，无信号肽和跨膜结构，属于PLN03069超级家族；ChChlH与铁皮石斛ChlH亲缘关系较近，其中铁皮石斛ChlH与ChlI和ChlD发生蛋白互作；*ChChlH*启动子包含光响应及脱落酸、乙烯、赤霉素、水杨酸、茉莉酸甲酯信号响应元件，具有MYB、WRKY结合位点；*ChChlH*在叶中表达量较高，且绿叶区域中的表达量显著高于叶艺区域叶片中的表达量。沉默*ChChlH*后烟草老叶中的光合色素含量及*ChlH*基因的相对表达量显著降低。【结论】明确了*ChChlH*基因的序列和表达特征模式，该基因可能在叶绿素合成和叶色变异中发挥重要作用。

关键词： 杂交兰；镁螯合酶H亚基基因；基因克隆；生物信息学分析；表达分析
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1359

Cloning and Expression Analysis of *ChChlH* Gene in *Cymbidium* hybrid

LIN Rong-yan KONG Lan WU Jian-she LIN Bing ZHONG Huai-qin*
(*Crop Research Institute (Fujian Provincial Germplasm Resource Center), Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fujian Engineering Research Center for Characteristic Floriculture, Fuzhou* 350013)

Abstract: 【Objective】The magnesium chelatase H subunit gene (*ChlH*) was cloned from *Cymbidium* hybrid, and its expression patterns and function were analyzed, thereby providing important insights into the regulatory role of the *ChlH* gene in leaf color variation in *Cymbidium* hybrid. 【Method】The *ChChlH* gene sequence was cloned by RT-PCR and RACE, followed by bioinformatics analysis. The promoter sequence of the *ChChlH* gene was obtained via genome walking, and its *cis*-acting elements were analyzed. The expression patterns of *ChChlH* in different tissues and different cultivars were examined using RT-qPCR. Furthermore, the effect of *ChChlH* silencing on leaf color variation in *Nicotiana tabacum* was verified using a virus-induced gene silencing (VIGS) system. 【Result】The full-length sequence of *ChChlH* is 4 321 bp, with a coding region of 4 155 bp encoding 1 384 amino acids, and its GenBank accession number is OL741687.1. Bioinformatics analysis indicates that the ChChlH protein might be a hydrophilic and unstable protein, lacking a signal peptide and transmembrane domains, and belongs to the PLN03069 superfamily. ChChlH showed high affinity with the ChlH protein from *Dendrobium catenatum*, which is known to interact with ChlI and ChlD. Promoter analysis revealed that the *ChChlH* promoter contains light-responsive elements, as well as *cis*-acting elements involved in responses to abscisic acid, ethylene, gibberellin, salicylic acid, and methyl jasmonate, along with MYB and WRKY transcription factor binding sites. Expression analysis showed that *ChChlH* was highly expressed in leaves, with significantly higher transcript levels in green leaf areas than in variegated regions. Silencing of *ChChlH* in *N. tabacum* led to a significant reduction in photosynthetic pigment content and *ChlH* expression in older leaves. 【Conclusion】The study clarified the sequence and expression pattern of the *ChChlH* gene, which may play an

收稿日期：2025-12-12
基金项目：福建省属公益类科研院所专项（2024R1030004），福建省自然科学基金项目（2023J01199），福建省农业科学院英才项目（YC2021013），福建省农业科学院优秀科技创新人才专项（YCZX202502）
*通信作者：钟淮钦 zhqeast@163.com

important role in chlorophyll synthesis and the variation of leaf color.

Keywords: *Cymbidium* hybrid; magnesium chelatase H subunit gene; gene cloning; bioinformatics analysis; expression analysis

叶色变异是观赏植物种质创新与品质提升的重要研究方向，其不仅直接决定了植物的观赏价值，也与光合效率及抗逆性等生理功能密切相关[1]。叶绿素代谢是叶色形成的基础，其中镁离子螯合酶是叶绿素合成途径中的一个关键酶，由3个亚基ChlI、ChlD和ChlH组成，催化镁离子螯合进入原卟啉IX，生成镁原卟啉IX，这一反应是叶绿素合成的限速步骤[2]。H亚基（CHLH）因其兼具催化底物结合、调控酶活性以及参与多种信号通路的枢纽功能，成为解析叶色变异分子机制的一个理想候选基因[3-4]。

近年来，叶绿素代谢相关基因在植物叶色变异中的作用已得到广泛关注[5-8]，关于*CHLH*基因的研究也取得一系列进展，充分证明了其调控叶色变异的巨大潜力。在棉花（*Gossypium arboreum*）黄化突变体的研究中，*GaCHLH*基因在第1 549位碱基处发生单核苷酸突变（G转A），导致第517位的甘氨酸（G）被丝氨酸（S）取代，GaChlh蛋白二级结构异常，并使其无法与D亚基（GaCHLD）正常互作，从而破坏镁螯合酶的组装与功能，最终引发叶绿素合成受阻与叶片黄化表型[9]；通过农杆菌介导法利用病毒诱导的基因沉默（VIGS）技术调控大别山冬青（*Ilex dabieshanensis*）*ChlH*基因的表达，侵染21 d的叶片表现出明显的黄化表型[10]。此外，在舒马栎（*Shumard Oak*）[11]、烟草（*Nicotiana tabacum*）[12]、连翘（*Forsythia*）[13]等物种中的研究也表明，*ChlH*基因的表达与叶绿素合成及叶色形成紧密相关，其功能缺失可能导致黄化性状的出现。这一发现为在观赏植物中利用该基因创制叶色突变体提供了坚实的理论依据和可行的技术路径。

杂交兰（*Cymbidium* hybrid）是由国兰和大花蕙兰杂交而成的一类兰属植物，其叶艺品种因独特的叶艺表现（如爪艺、中透艺）而具有极高的观赏和经济价值[14]。然而，叶艺性状形成（叶色变异）的分子机制尚不明确，严重制约了杂交兰品种叶色改良效率。课题组前期以杂交兰绿叶品种‘紫妍氏’及其叶艺品种‘福韵西施’和‘中透紫妍氏’为材料进行转录组测序，发现*ChlH*基因为显著差异表达基因，在‘紫妍氏’绿叶中的表达量显著高于‘福韵西施’和‘中透紫妍氏’，而关于该基因在这2个叶艺品种叶色变异中的作用机制还未可知。

基于此，本研究采用RT-PCR、RACE、基因组步移法等手段从杂交兰叶片中克隆获得*ChlH*基因序列，对其分子特征、差异表达规律、顺式作用元件等进行分析，并利用VIGS技术构建*ChChlH*沉默载体，转化烟草叶片，为后续杂交兰*ChChlH*基因的功能验证和叶色变异分子机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验中所用杂交兰材料为保存于福建省农业科学院作物研究所花卉研究室的‘紫妍氏’（K21，叶片绿色）、‘福韵西施’（K21-1，叶片绿色浅黄边）和‘中透紫妍氏’（K21-3，叶片黄色带绿边）。采集K21、K21-1和K21-3的叶片用于基因序列克隆，K21的根、茎、叶及K21-1和K21-3的绿叶和叶艺区域叶片用于基因表达分析检测。

1.2 方法

1.2.1 杂交兰样品DNA、RNA的提取及cDNA的合成 利用通用基因组DNA提取试剂盒Ver.5.0（TaKaRa）进行杂交兰样品基因组DNA提取；采用通用植物总RNA提取试剂盒（BioTeke）进行杂交兰不同组织总RNA的提取，通过1%琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测DNA和RNA的质量和浓度，合格产物用于后续试验。使用PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒（TaKaRa）进行cDNA第一链的合成，并将其中的Oligo dT接头引物替换为AP进行逆转录。

1.2.2 杂交兰*ChlH*基因序列克隆 基于NCBI数据库，查找获得*ChlH*基因参考序列（XM_020824640.2），设计一对引物*ChlH*-F/*ChlH*-R（表1），用于保守区的扩增。经PCR扩增、产物检测和回收、载体连接和转化、菌液PCR检测、阳性克隆测序、Blast序列验证，获得正确的保守区序列。在此基础上，根据测序结果分别设计2条正向特异引物*ChlH*-3′-1和*ChlH*-3′-2及2条反向特异引物*ChlH*-5′-1和*ChlH*-5′-2，用于3′ RACE和5′ RACE扩增。拼接获得的各片段序

列，得到该基因的cDNA全长。在此基础上，设计一对引物*ChlH*-ORF-F/*ChlH*-ORF-R，用于ORF序列验证。根据已知*ChlH*基因序列，设计合成3条反向特异性引物：*ChlH*-SP1、*ChlH*-SP2、*ChlH*-SP3；利用基因组步移试剂盒（TaKaRa）中的AP引物和3条特异性引物进行3轮PCR扩增；取适量的上轮PCR产物作为下轮PCR模板。取适量的3次PCR产物按顺序进行电泳，从凝胶中回收清晰的条带；回收的PCR产物以*ChlH*-SP3为引物进行测序，测序结果与参考序列比对，获得*ChlH*基因的启动子序列。

表1　杂交兰*ChlH*基因克隆及RT-qPCR所用引物

Table 1　Primers used in *ChlH* clone and RT-qPCR in *Cymbidium* hybrid

引物名称 Primer Name	引物序列 Primer sequence	作用 Function
AP	5′-GGCCACGCGTCGACTAGTAC$(T)_{17}$-3′	逆转录引物 Reverse transcription primer
AAP	5′-GGCCACGCGTCGACTAGTAC$(G)_8$-3′	锚定引物
AUAP	5′-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3′	Anchored primers
ChlH-F	5′-CAATGGCTTCTCTGGTTTTCACTC-3′	保守区扩增引物
ChlH-R	5′-TTAGCGCTCAATACCCTCGATCT-3′	Conserved fragment amplification primers
ChlH-3′-1	5′-GAATCTCGTACAGTCACTTAGGCGCGA-3′	3′ RACE引物
ChlH-3′-2	5′-TATGAGGGGATGATGAGGAGC-3′	3′ RACE primers
ChlH-5′-1	5′-AGAAGGTGCGGTAAGTGGTCTCGTC-3′	5′ RACE引物
ChlH-5′-2	5′-CGTTGCAGAAGAAGACCCTTGAT-3′	5′ RACE primers
ChlH-ORF-F	5′-ACTGCCCGCGATCACTTCCTCAGC-3′	ORF扩增引物
ChlH-ORF-R	5′-CAAAAATACAAACAGTCCAACTCCTG-3′	ORF amplification primers
ChlH-SP1	5′-CGAAGATGAGCGAGCCGATGAATACG-3′	启动子序列引物
ChlH-SP2	5′-GACTGCGGCGGATAGGGAGGATTGGTACTG-3′	Promoter sequence primers
ChlH-SP3	5′-TTGATGTGGGTTGTTGGGTGAGGCGGGGAAGG-3′	
ChACT-F	5′-GGGTGCTTATGTTGGTGATG-3′	内参基因引物
ChACT-R	5′-TTCAGAGGGGCTTCAGTAAGG-3′	For the internal control
ChlH-RT-F	5′-TTCAGCAGCCCTAACCTCAACGTCGCT-3′	RT-qPCR引物（杂交兰）
ChlH-RT-R	5′-GAAGGAGTAGTAGGCGGCAAAGCCATGGTG-3′	RT-qPCR（*Cymbidium* hybrid）
ChChlH-VIGS-F	5′-CGACGACAAGACCGTCACCCCCGGTGAACAACAAGCCTTTCGT-3′	VIGS引物
ChChlH-VIGS-R	5′-GAGGAGAAGAGCCGTCGGCCCATCTTATAGCTCTTGTACATAG-3′	VIGS primers
ChChlH-RT-F	5′-CCCGGTGAACAACAAGCCTTTCGT-3′	RT-qPCR引物（烟草）
ChChlH-RT-R	5′-GCATCCCTGCCGGAAAACACTATCGG-3′	RT-qPCR（*N. tabacum*）

1.2.3　杂交兰ChChlH蛋白生物信息学分析　将杂交兰*ChChlH*基因ORF序列翻译为氨基酸序列后，利用ExPASy在线软件分析蛋白的理化性质；利用TMHMM-2.0、NetPhos-3.1、WoLF PSORT、SOPMA预测蛋白的跨膜结构、磷酸化位点、亚细胞定位、二级结构；采用NCBI Conserved Domain Search数据库分析保守结构域。除ChChlH蛋白质序列（UKI61040.1）外，从NCBI数据库中下载20个不同物种的ChlH蛋白质序列，进行序列比对和系统进化树构建。20个物种分别为铁皮石斛（*Dendrobium catenatum*，XP_020680299.1）、海枣（*Phoenix dactylifera*，XP_008802639.2）、油棕（*Elaeis guineensis*，XP_010938532.1）、深圳拟兰（*Apostasia shenzhenica*，PKA62593.1）、木薯（*Manihot esculenta*，XP_021619948.1）、菠萝（*Ananas comosus*，XP_020108684.1）、决明（*Senna tora*，KAF7819031.1）、麻风树（*Jatropha curcas*，XP_012086160.1）、姜（*Zingiber officinale*，XP_042457778.1）、榴莲（*Durio zibethinus*，XP_022766664.1）、康藏嵩草（*Carex littledalei*，KAF3326171.1）、哥伦比亚锦葵（*Herrania umbratica*，XP_021281964.1）、三裂叶薯（*Ipomoea triloba*，XP_031127328.1）、大豆（*Glycine max*，

XP_003535922.1）、美人蕉（*Canna indica*，WOL00538.1）、橡胶树（*Hevea brasiliensis*，XP_021673241.1）、花生（*Arachis hypogaea*，XP_025650653.1）、白牧豆树（*Prosopis alba*，XP_028774467.1）、蓖麻（*Ricinus communis*，XP_015582646.1）、河岸葡萄（*Vitis riparia*，XP_034694906.1），利用DNAMAN软件进行序列比对，采用MEGA5.0软件的邻位相连法（neighbor-joining）构建系统进化树。使用PlantCARE软件在线预测*ChChlH*启动子含有的顺式作用元件，使用PlantTFDB在线数据库进行*ChChlH*启动子序列转录因子结合位点预测，利用STRING数据库在线进行ChChlH蛋白互作分析。

1.2.4 杂交兰*ChChlH*基因定量表达分析 以K21的根、茎、叶及K21-1和K21-3不同区域叶片cDNA为模板，*ChACT*为内参基因，使用SYBR Premix Ex Taq^{TM}试剂盒，在7500 Real-Time PCR System仪上检测*ChChlH*基因在各个模板中的相对表达量，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算。

1.2.5 VIGS重组载体pTRV2-*ChChlH*的构建 基于获得的*ChChlh*基因序列，设计引物*ChChlH*-VIGS-F和*ChChlH*-VIGS-R（表1），以K21叶片cDNA为模板，进行PCR扩增。扩增产物经电泳验证后，进行目的条带回收纯化、连接TRV2载体、转化至大肠杆菌DH5α、重组载体PCR鉴定与测序。而后，将序列比对完全正确的大肠杆菌质粒转化至农杆菌GV3101，经2–3 d培养后，挑选阳性单克隆送测。

1.2.6 VIGS后烟草叶片叶绿素含量及*ChlH*基因相对表达量测定 活化、重悬pTRV2-00载体和pTRV2-ChChl载体，将其注射于生长状态较为一致的烟草幼苗（子叶全展开且真叶还未露出时）叶片，培养约20 d后，观察比较注射pTRV2-00载体、pTRV2-*ChChlH*载体及未注射载体的烟草表型。利用乙醇提取比色法进行烟草叶片叶绿素含量测定，利用RT-qPCR法进行*ChlH*基因的相对表达量检测。

2 结果

2.1 杂交兰*ChlH*基因序列的获得

以杂交兰K21叶片cDNA为模板，测序后得到4 156 bp、411 bp和206 bp的保守区、3′端和5′端序列（图1-A），测序结果经GenBank数据库在线Blast比对，与铁皮石斛（*D. catenatum*）、蝴蝶兰（*Phalaenopsis equestris*）等兰科植物*CHLH*序列的相似性较高，可达92.62%，表明所得片段为杂交兰*ChlH*基因片段序列。将所获得的3个片段序列进行拼接，得到一条长度为4 321 bp的cDNA序列，经序列扩增验证，命名为*ChChlH*，GenBank登录号为OL741687.1。以杂交兰K21-1及K21-3叶片cDNA为模板，进行ORF序列的PCR扩增，得到约4 300 bp的条带（图1-A），将测序结果进行比对后，获得完全一致的*ChlH*基因序列。

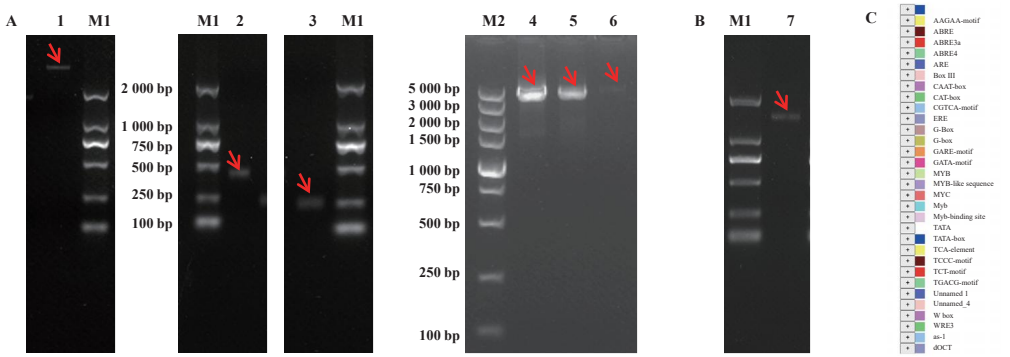
2.2 *ChChlH*启动子序列的克隆和分析

以K21基因组DNA为模板，利用基因组步移法进行启动子序列的克隆（图1-B），最终得到*ChChlH*起始密码子ATG上游-1 621–-1 bp启动子序列，其中胸腺嘧啶（T）为489个（30.2%），腺嘌呤（A）为464个（28.6%），胞嘧啶（C）为360个（22.2%），鸟嘌呤（G）为308个（19.0%）。

利用PlantCARE在线数据库分析该启动子片段包含的关键顺式作用调控元件。结果（图1-C）显示，该片段启动子除具有核心启动子元件（CAAT-box、TATA-box等）外，还具备光响应元件（G-Box、G-box、GATA-motif、TCCC-motif、TCT-motif）、厌氧诱导响应元件（ARE）、响应脱落酸（ABRE）、乙烯（ERE）、赤霉素（GARE-motif）、水杨酸（TCA-element）、茉莉酸甲酯（CGTCA-motif、TGACG-motif）的激素信号元件、与分生组织表达相关的调控元件（CAT-box）以及MYB转录因子的结合位点。使用PlantTFDB在线数据库对该启动子片段转录因子结合位点预测，结果显示，当*P*-value≤$1e^{-5}$时，该片段启动子含有76个转录因子结合位点，其中WRKY结合位点32个、MYB结合位点14个、BES1结合位点8个、BBR-BPC结合位点7个、bHLH结合位点5个、C2H2结合位点4个、NAC和bZIP结合位点各2个、Nin-like和MYB-related结合位点各1个。

2.3 ChChlH蛋白序列的生物信息学分析

经理化性质分析，发现ChChlH蛋白由1 384个氨基酸组成，分子量为154 002.91（分子式：$C_{6896}H_{10881}N_{1855}O_{2057}S_{41}$），理论等电点为5.96，由20种氨基酸组成，其中Leu（10.3%）、Ala（8.0%）和



A：*ChlH*序列扩增产物（M1：DL 2 000 Marker；M2：DL 5 000 Marker；1：保守区扩增条带；2：3′ RACE扩增条带；3：5′ RACE扩增条带；4–6：ORF验证条带）；B：*ChChlH*启动子序列扩增产物（7：启动子序列扩增条带）；C：*ChChlH*启动子作用元件预测

A: Amplification product of *ChlH* sequence (M1: DL 2 000 Marker; M2: DL 5 000 Marker; 1: conserved region amplification band; 2: 3′ RACE amplification band; 3: 5′ RACE amplification band; 4–6: ORF verification bands). B: Amplification product of the *ChChlH* promoter sequence (7: promoter amplification band). C: Promoter acting elements prediction of *ChChlH*

图1　杂交兰*ChlH*序列扩增产物及启动子作用元件预测

Fig. 1　Amplification products of *ChlH* gene from *Cymbidium* hybrid and prediction of its promoter *cis*-acting elements

Val（7.9%）所占比重较大，Trp和Cys含量最低。正、负电荷氨基酸残基总数分别为156和170。脂肪系数为89.75，不稳定系数为40.83，平均亲水性为-0.227，其亲水性上、下限分别为2.844和-3.533，亲水区域多于疏水区域（图2-A），表明其属于不稳定亲水性蛋白。ChChlH不具有信号肽，不存在跨膜区域，全部氨基酸在膜外，定位于叶绿体的可能性最大。蛋白质磷酸化位点分析显示（图2-B），ChChlH具有丝氨酸（72个）、苏氨酸（44个）和酪氨酸（22个）的活性位点，主要被unsp、PKC、cdc2、CKII等蛋白激酶磷酸化修饰。二级结构预测结果显示（图2-C），ChChlH蛋白中α-螺旋结构占主导位置，为48.70%，其余依次为无规则卷曲（34.68%）、延伸链（11.63%）和β-转角（4.99%）。杂交兰ChChlH蛋白属于PLN03069超级家族，即镁原卟啉-IX螯合酶亚基H家族，56–1 263 aa为保守结构域（图2-D）。

2.4　杂交兰Ch*ChlH*基因编码蛋白质的序列比对、进化分析与蛋白互作分析

多序列比对结果（附图）显示，杂交兰ChChlH与其他20个物种中ChlH蛋白序列的一致性达91.67%。系统进化树结果（图3-A）显示，所选蛋白序列被分为2个分支，其中杂交兰ChChlH与同为兰科植物的铁皮石斛ChlH（*Dendrobium catenatum*，XP_020680299.1）、深圳拟兰ChlH（*Apostasia shenzhenica*，PKA62593.1）处于同一分支中，亲缘关系较近。进一步分析发现ChChlH与铁皮石斛ChlH的相似性可达93.86%，选择铁皮石斛的ChlH与蛋白数据库中其他蛋白进行互作分析（图3-B），结果显示ChlH与镁离子螯合酶I亚基（CHLI）、镁离子螯合酶D亚基（CHLD）、镁原卟啉甲基转移酶（MA16_Dca003472）、原卟啉原氧化酶（PPXII）、铁螯合酶（HEMH）家族的2个成员（HEMH-2、HEMH）、镁原卟啉IX单甲酯（氧化）环化酶（CRD1）发生蛋白互作，还可能与叶绿素合酶（CHLG）、香叶基香叶基还原酶（CHLP）家族的2个成员（CHLP、CHLP-2）发生蛋白互作。

2.5　杂交兰*ChChlH*基因定量表达分析

比较不同组织中*ChChlH*基因的表达情况，结果（图4-A）显示，*ChChlH*基因的表达存在组织差异性，叶中的相对表达量显著高于根和茎中的相对表达量，在K21叶中*ChChlH*基因的相对表达量是K21根中的32.51倍。比较不同品种叶片部位中*ChChlH*基因的表达情况，结果（图4-B）显示，K21和K21-1绿叶中*ChChlH*基因相对表达量显著高于K21-3绿叶区域；K21-1和K21-3绿叶区域中的*ChChlH*基因相对表达量显著高于其相应的叶艺区域。

2.6　VIGS重组载体pTRV2-*ChChlH*的构建

经测序比对，获得与预期结果一致的*ChChlH*目的序列，基因片段长度为342 bp，无碱基突变，表明重组载体pTRV2-*ChChlH*构建成功（图5-A）。将

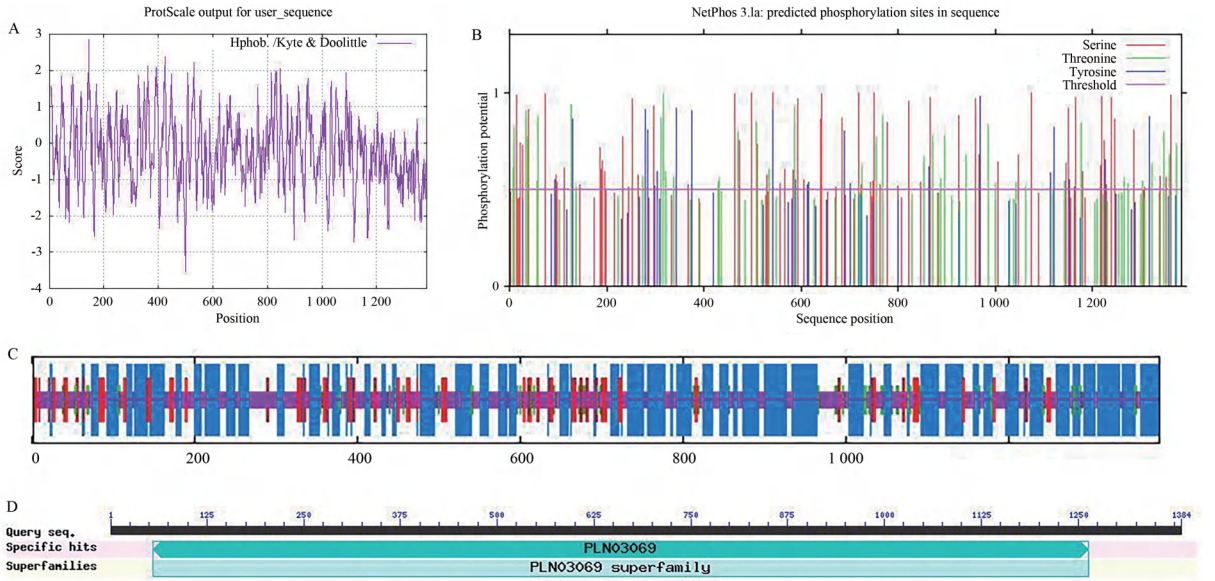


图2 杂交兰ChChlH蛋白亲/疏水性(A)、磷酸化位点(B)、二级结构(C)和保守结构域(D)预测

Fig. 2 Prediction of the hydrophilicity/hydrophobicity (A), phosphorylation sites (B), secondary structure (C), and conserved domain structure (D) of ChChlH in *Cymbidium* hybrid

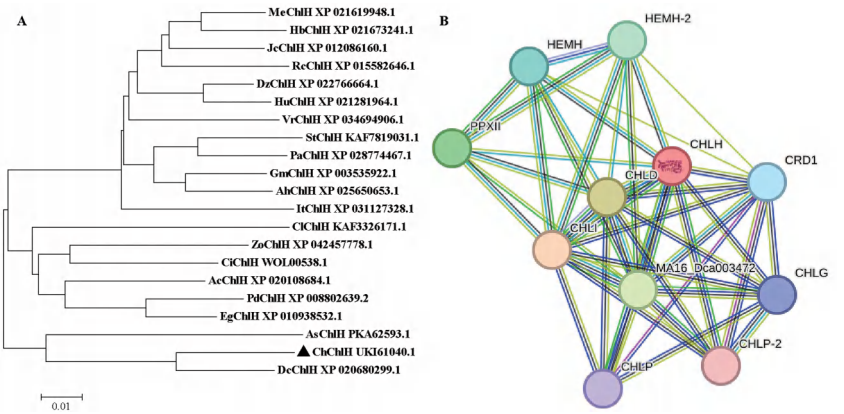


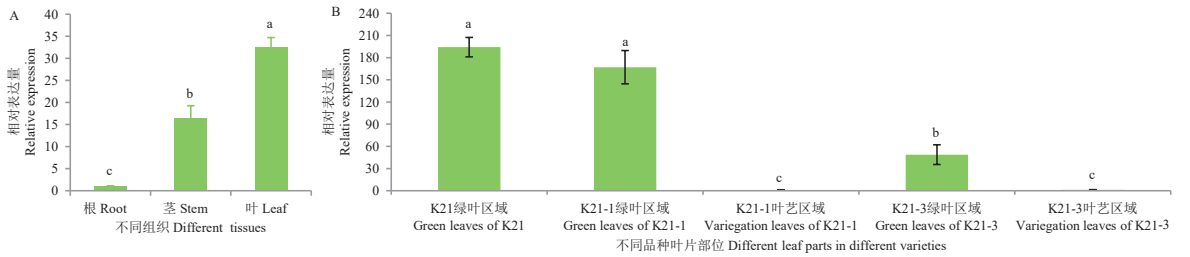
图3 杂交兰ChlH系统进化树分析(A)和蛋白质互作分析(B)

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis (A) and protein interaction analysis (B) of *Cymbidium* hybird ChlH

含有pTRV1、pTRV2及pTRV2-*ChChlH*的质粒转化农杆菌，获得清晰单一的目的条带，其位置处于250–500 bp，在预测长度范围内。结果表明成功获得Agro:pTRV2-*ChChlH*。

2.7 注射VIGS重组载体后烟草叶片光合色素含量及*ChlH*基因相对表达量

通过序列比对，发现烟草*ChlH*基因序列（NM_001325713.1）与杂交兰*ChChlH*沉默序列的一致性达71.64%，初步选择烟草作为注射植株。比较注射pTRV2-00载体、注射pTRV2-*ChChlH*载体及未处理的烟草植株表型，发现注射pTRV2-*ChChlH*载体的烟草植株老叶在培养20 d后出现黄化现象（图5-B），而注射pTRV2-00载体的烟草植株与未处理植株相比无明显症状。进一步比较不同处理植株老叶中的光合色素含量及*ChlH*基因相对表达量，发现注射pTRV2-00载体、pTRV2-*ChChlH*载体后的烟草植株老叶中的叶绿素a、叶绿素b、总叶绿素含量及*ChlH*基因的相对表达量均显著低于未处理烟草植株

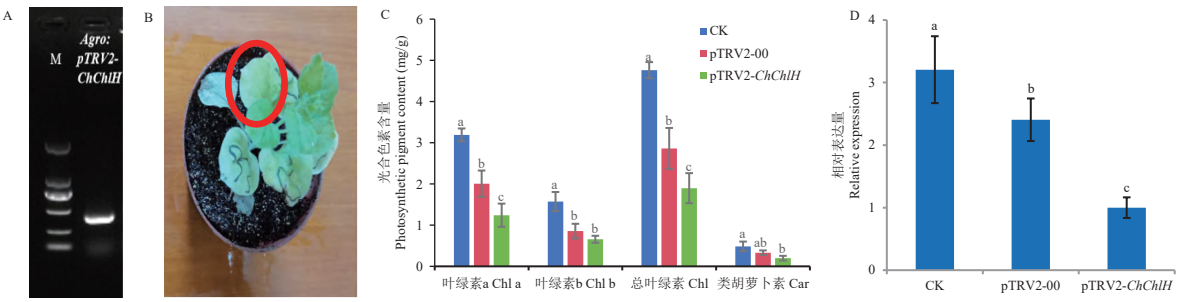


不同字母表示显著性差异（$P<0.05$），下同

Different letters indicate significant differences ($P<0.05$), the same below

图4　杂交兰*ChChlH*基因的表达情况分析

Fig. 4　Expression analysis of *ChChlH* in *Cymbidium* hybrid



A：重组载体 pTRV2-*ChChlH*扩增产物（M：DL 2 000 Marker）；B：注射pTRV2-*ChChlH*载体后的烟草表型；C：注射不同载体后烟草叶片光合色素含量；D：注射不同载体后*ChChlH*基因的相对表达量

A: Amplification product of the recombinant vector pTRV2-*ChChlH* (M: DL 2 000 Marker). B: Phenotype of tobacco after the pTRV2-*ChChlH* vector injection. C: Content of photosynthetic pigments in tobacco leaves after different vector injection. D: Relative expression of *ChChlH* gene after different vectors injection

图5　重组载体的构建及*ChChlH*基因沉默植株的效果分析

Fig. 5　Construction of recombinant vectors and the effect analysis of *ChChlH* gene silencing plants

（图5-C，D），其中注射携带pTRV2-*ChChlH*载体农杆菌的烟草植株老叶中*ChlH*基因的相对表达量仅为未处理烟草植株的31.19%；注射pTRV2-00载体、pTRV2-*ChChlH*载体后，烟草植株老叶中的类胡萝卜素含量低于未处理烟草植株，但注射pTRV2-00载体后的植株叶片类胡萝卜素含量与其他2个处理未存在显著差异。

3　讨论

镁离子螯合酶H亚基（ChlH）是叶绿素生物合成途径中的关键限速酶之一，其基因表达水平和碱基突变对叶绿素的合成和叶片呈色具有重要影响。比较连翘（*Forsythia*）黄色叶和绿色叶株系叶片*ChlH*基因的表达量时，*ChlH*基因表达量越高，叶绿素含量越高，叶片越绿；进一步利用VIGS、瞬时过表达和转录组测序技术对*ChlH*基因进行功能验证，发现其通过控制叶绿素合成通路基因，影响连翘叶片叶绿素含量和叶片颜色[15]。甘蓝型油菜突变体（yvl）的心叶呈现叶绿素含量降低，叶绿体发育滞缓的表型特征，*ChlH*基因的碱基突变（C到T）致使基因提前终止是导致心叶黄化的重要原因[16]；*ChlH*还被用作VIGS的靶标，在浸润6 d后的长春花（*Catharanthus roseus*）幼苗中观察到黄色子叶，且子叶的*CrChlH*表达和叶绿素含量显著降低[17]。本研究发现，*ChChlH*在杂交兰绿色叶片组织中高表达，而在黄化的叶艺区域表达量显著降低，这一表达模式与叶绿素含量的空间分布完全吻合[14]，说明*ChChlH*的表达下调可能导致叶艺区域叶绿素合成不足，从而产生黄化表型。进一步的VIGS功能验证证实了这一关系，在烟草中沉默该基因可导致叶绿素a、叶绿素b及总叶绿素含量均发生同步且显著的下降，叶片出现黄化表型。此发现与在其他物种中

的研究结论相符，即*CHLH*基因的表达水平与叶绿素含量具有极大的正相关[18-20]。

生物信息学分析显示，ChChlH蛋白无信号肽与跨膜结构，属于亲水性不稳定蛋白，具有PLN03069超家族的典型特征，与同属兰科植物的铁皮石斛亲缘关系最近，氨基酸序列一致性较高，说明该基因在兰科植物中具有功能保守性。蛋白互作分析显示铁皮石斛ChlH与CHLI、CHLD发生蛋白互作，这与镁螯合酶H亚基在镁螯合酶复合体中催化镁离子螯合的功能相吻合[21-23]。此外，ChlH通过与上游（PPXⅡ）、并行分支（HEMH）和下游多个酶（MA16_Dca003472、CHLG、CHLP、CRD1）的互作，共同构成协同工作的代谢网络，在空间上锚定了整个叶绿素合成代谢流，揭示定位于叶绿体的*ChlH*在植物叶绿素积累中的重要作用[24]。

研究表明，CHLH是一种多功能蛋白，参与四吡咯生物合成、叶绿体信号传导以及脱落酸、乙烯、干旱等响应[25-28]。CHLH的短时间失活迅速导致相应酶活性降低以及镁卟啉水平改变，长时间失活导致四吡咯相关基因的转录水平有所升高[29]；甘薯（*Ipomoea batatas*）*IbCHLH*基因在干旱胁迫24 h和外源脱落酸处理4 h时表达量最高，推测其可能参与抗旱调节和脱落酸的调控[30]；茶树（*Camellia sinensis*）*CsChlH*在脱落酸和乙烯利处理6 h和12 h时上调表达；且4 ℃低温和干旱胁迫抑制其表达，而长时间38 ℃则诱导其表达[31]。本研究中，*ChChlH*启动子区域富含光响应元件、厌氧诱导元件以及MYB、WRKY等转录因子结合位点，同时包含脱落酸、乙烯、赤霉素、茉莉酸甲酯和水杨酸等多种激素应答元件。提示*ChChlH*的表达受到复杂而精细的转录调控，其能够整合环境信号与内源激素信号，从而适应生长发育及逆境响应需求。

综上所述，本研究通过基因克隆、生物信息学、表达分析和功能验证，阐明*ChChlH*是一个定位于叶绿体、受多因素调控、在杂交兰叶绿素合成中发挥关键作用的基因，其在叶艺区域的特异性低表达是导致杂交兰叶色变异的重要机制。后续可通过杂交兰稳定的遗传转化体系进一步确认其功能，加深了对兰科植物叶色发育分子机理的理解，创制叶艺新种质，为最终实现杂交兰叶艺性状的分子设计育种奠定坚实的理论与技术基础。

4 结论

从杂交兰叶片中克隆获得叶绿素生物合成途径的关键基因*ChChlH*，ChChlH蛋白与铁皮石斛ChlH亲缘关系最近，功能可能相似，与镁离子螯合酶其他亚基、镁原卟啉甲基转移酶、叶绿素合酶等多个叶绿素合成通路中的酶发生互作。*ChChlH*在叶中表达量较高，且绿叶区域中的表达量显著高于叶艺区域叶片中的表达量，沉默*ChChlH*后烟草老叶中的叶绿素含量及*ChlH*基因的相对表达量显著降低，推测*ChChlH*表达水平与叶绿素含量密切相关，可能在叶绿素合成和叶色变异中的发挥重要作用。

文章所有附图附表请点击链接查看（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260604085751_NewsFile_86.pdf）

参考文献

[1] Yang GS, Yao HX, He FM, et al. Unveiling CcR2R3-MYB: a key regulator of leaf pigmentation in *Cymbidium* Orchids [J]. Horticulturae, 2025, 11(2): 190.

[2] Xu DW, Lin L, Liu XR, et al. Characterization of a tomato *chlh* mis-sense mutant reveals a new function of ChlH in fruit ripening [J]. Plant Biotechnol J, 2025, 23(3): 911-926.

[3] Tran LH, Kim JG, Jung S. Expression of the *Arabidopsis* Mg-chelatase H subunit alleviates iron deficiency-induced stress in transgenic rice [J]. Front Plant Sci, 2023, 14: 1098808.

[4] Sun MM, Shen YY. Integrating the multiple functions of CHLH into chloroplast-derived signaling fundamental to plant development and adaptation as well as fruit ripening [J]. Plant Sci, 2024, 338: 111892.

[5] Zhang CY, Liu HR, Wang JY, et al. A key mutation in magnesium chelatase I subunit leads to a chlorophyll-deficient mutant of tea (*Camellia sinensis*) [J]. J Exp Bot, 2024, 75(3): 935-946.

[6] Wang SL, Chen M, Zhou QH, et al. Transcriptome-metabolome integration reveals mechanisms of leaf color variation in leafy vegetable sweet potato [J]. Horticulturae, 2025, 11(11): 1317.

[7] Ma YY, Shi JC, Wang DJ, et al. A point mutation in the gene encoding magnesium chelatase I subunit influences strawberry leaf color and metabolism [J]. Plant Physiol, 2023, 192(4): 2737-2755.

[8] Shi C, Gu MF, Huang YJ, et al. Integrated genomic and transcriptomic analysis reveals the mechanisms underlying leaf variegation in 'Gonggan' mandarin [J]. BMC Plant Biol, 2025, 25: 472.

[9] Fan LQ, Hou Y, Zheng L, et al. Characterization and fine mapping of a yellow leaf gene regulating chlorophyll biosynthesis and chloroplast development in cotton (*Gossypium arboreum*) [J]. Gene, 2023, 885: 147712.

[10] Chong XR, Wang Y, Xu XY, et al. Efficient virus-induced gene silencing in *Ilex dabieshanensis* using tobacco rattle virus [J]. Forests, 2023, 14(3): 488.

[11] Dong XY, Huang LB, Chen QS, et al. Physiological and anatomical differences and differentially expressed genes reveal yellow leaf coloration in shumard oak [J]. Plants, 2020, 9(2): 169.

[12] 唐琴, 段丽丽, 皮凯, 等. 烟草*NtChlH*基因的克隆及表达模式分析 [J]. 西南农业学报, 2024, 37(12): 2592-2601.
Tang Q, Duan LL, Pi K, et al. Cloning and expression pattern analysis of *NtChlH* gene from *Nicotiana tabacum* [J]. Southwest China J Agric Sci, 2024, 37(12): 2592-2601.

[13] Zhang M, Shen JS, Wu YT, et al. Comparative transcriptome analysis identified ChlH and POLGAMMA2 in regulating yellow-leaf coloration in *Forsythia* [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 1009575.

[14] 钟淮钦, 林榕燕, 吴建设, 等. 杂交兰‘紫妍氏’叶艺性状的生理生化与细胞结构分析 [J]. 西北植物学报, 2021, 41(7): 1165-1174.
Zhong HQ, Lin RY, Wu JS, et al. Physiological, biochemical and cell structure analysis of leaf mutant traits in *Cymbidium* hybrid ‘purple element’ [J]. Acta Bot Boreali Occidentalia Sin, 2021, 41(7): 1165-1174.

[15] 吴雨桐. *POLGAMMA2*和*ChlH*基因在连翘金色叶形成中的作用 [D]. 北京: 北京林业大学, 2021.
Wu YT. The function of *POLGAMMA2* and *ChlH* gene in the formation of yellow leaves of *Forsythia* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2021.

[16] 赵传纪. 甘蓝型油菜叶色、花色和株高突变体的遗传分析与定位克隆 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
Zhao CJ. Genetic analysis and positional cloning of leaf color, flower color and plant height mutants in *Brassica napus* L. [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020.

[17] Liu YL, Lyu RQ, Singleton JJ, et al. A Cotyledon-based virus-induced gene silencing (Cotyledon-VIGS) approach to study specialized metabolism in medicinal plants [J]. Plant Meth, 2024, 20: 26.

[18] Tian YY, Wang HY, Zhang ZQ, et al. An RNA-seq analysis reveals differential transcriptional responses to different light qualities in leaf color of *Camellia sinensis* cv. huangjinya [J]. J Plant Growth Regul, 2022, 41(2): 612-627.

[19] Ren J, Sun L, Wang CL, et al. Expression analysis of the cDNA for magnesium chelatase H subunit (CHLH) during sweet cherry fruit ripening and under stress conditions [J]. Plant Growth Regul, 2011, 63(3): 301-307.

[20] Li YS, Wang XY, Zhang QH, et al. A mutation in SlCHLH encoding a magnesium chelatase H subunit is involved in the formation of yellow stigma in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. Plant Sci, 2022, 325: 111466.

[21] 刘子琦, 汪佳. 镁螯合酶的结构与功能 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34(1): 18-24.
Liu ZQ, Wang J. Structure and function of the magnesium chelatase [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2018, 34(1): 18-24.

[22] Zhao ZF, Li J, Zhao XL, et al. Mutation of a magnesium chelatase BrCHLD affects the chlorophyll content and magnesium chelatase activity in Chinese cabbage [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 228: 110319.

[23] Qi F, Xing PY, Sun YC, et al. Deletion of the gene encoding the magnesium chelatase I subunit resulted in a novel wheat leaf colour mutant [J]. Plant Biotechnol J, 2025, 23(10): 4290-4301.

[24] Gao F, Guo JX, Shen YY. Advances from chlorophyll biosynthesis to photosynthetic adaptation, evolution and signaling [J]. Plant Stress, 2024, 12: 100470.

[25] Ibata H, Nagatani A, Mochizuki N. CHLH/GUN5 function in tetrapyrrole metabolism is correlated with plastid signaling but not ABA responses in guard cells [J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 1650.

[26] Sato S, Hirose M, Tamiaki H, et al. Chelatase activity of magnesium dechelatase associated with chlorophyll degradation [J]. FEBS Lett, 2025, 599(15): 2210-2219.

[27] Zhang M, Zhao Y, Du JJ, et al. Integration of multi-omics data and phenotyping provides insights into purple leaf sheaths color in millet seedling stage [J]. BMC Plant Biol, 2025, 25: 1645.

[28] Zou YP, Zhuo T, Duan Y, et al. Transcriptomic and structural insights into leaf variegation development in *Ilex* × ‘solar flare’ [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(9): 3999.

[29] Schlicke H, Hartwig AS, Firtzlaff V, et al. Induced deactivation of genes encoding chlorophyll biosynthesis enzymes disentangles tetrapyrrole-mediated retrograde signaling [J]. Mol Plant, 2014, 7(7): 1211-1227.

[30] 王珧, 赵路宽, 高兵倩, 等. 甘薯镁螯合酶*IbCHLH*基因克隆及表达分析 [J]. 江苏师范大学学报: 自然科学版, 2024, 42(4): 14-20.
Wang Y, Zhao LK, Gao BQ, et al. Gene cloning and expression analysis of *IbCHLH* in sweetpotato [J]. J Jiangsu Norm Univ Nat Sci Ed, 2024, 42(4): 14-20.

[31] 叶玓璠, 王誉洁, 傅前媛, 等. 茶树镁离子螯合酶H亚基基因*CsChlH*的克隆及其表达分析 [J]. 园艺学报, 2024, 51(1): 91-102.
Ye YF, Wang YJ, Fu QY, et al. Cloning and expression analysis of Mg-chelatase H subunit gene *CsChlH* in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. Acta Hortic Sin, 2024, 51(1): 91-102.

（责任编辑　朱琳峰）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):238-249

丹参*RBOH*基因家族特征及盐胁迫响应分析

李贺勤[1, 2, 3] 闫恒宇[1, 2, 3] 袁语锌[1] 段炎炎[1] 李彩丽[4] 单成钢[5]
江绪文[1, 2, 3*]

(1.青岛农业大学农学院,青岛 230036; 2.盐碱地综合利用国家技术创新中心,东营 257347; 3.黄河三角洲盐碱地农业研究院,东营 257347; 4.中国医学科学院药用植物研究所,北京 100193; 5.山东省农业科学院经济作物研究所,济南 250100)

摘 要： 【目的】呼吸爆发氧化酶同源物（respiratory burst oxidase homologs, RBOHs）是植物活性氧（ROS）生成的关键限速酶，广泛参与植物逆境胁迫的调控过程。探究丹参*RBOHs*基因在盐胁迫应答及活性成分积累中的调控特征，为深入解析*SmRBOHs*基因功能、阐明其调控丹参活性成分积累的分子机制提供理论支撑。【方法】以拟南芥RBOH蛋白序列为参考，系统鉴定丹参*RBOHs*基因家族成员，全面解析其序列特征、进化关系、启动子顺式作用元件与转录因子结合位点，并构建其蛋白互作调控网络；结合转录组数据筛选与丹参活性成分生物合成通路基因共表达的*SmRBOHs*。通过盐胁迫处理试验，利用RT-qPCR等技术，系统分析*SmRBOHs*表达模式与ROS含量、丹酚酸和丹参酮积累的相关性。【结果】从丹参基因组中鉴定到6个*SmRBOHs*，系统进化分析可将其划分为3个亚组，其基因启动子区富含盐胁迫、脱落酸（abscisic acid, ABA）等逆境响应顺式元件和转录因子结合位点。该家族基因具有组织表达特异性，可差异化响应ABA信号，且与丹酚酸、丹参酮合成通路基因存在共表达关系。盐胁迫下，*SmRBOHs*各成员表达模式分化明显，其中*SmRBOH2*表达量与H_2O_2、丹参酮含量呈负相关，与丹酚酸积累呈正相关，其余家族成员则呈相反变化趋势。【结论】丹参*RBOHs*广泛参与植物激素介导的生理调控与盐胁迫应答过程，且其转录表达受多类转录因子调控。丹参或可通过ABA介导的SnRK2-RBOH信号模块，差异化调控丹酚酸与丹参酮的生物合成，进而参与盐胁迫适应性应答。

关键词： 丹参；*RBOH*基因家族；盐胁迫；表达模式；丹酚酸；丹参酮；H_2O_2；相关分析

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0593

Characterization of the *RBOH* Gene Family and Analysis of Its Salt Stress Responses in *Salvia miltiorrhiza*

LI He-qin[1, 2, 3] YAN Heng-yu[1, 2, 3] YUAN Yu-xin[1] DUAN Yan-yan[1] LI Cai-li[4] SHAN Cheng-gang[5]
JIANG Xu-wen[1, 2, 3*]

(1. *College of Agriculture, Qingdao Agricultural University, Qingdao* 230036; 2. *National Technology Innovation Center for Saline-Alkali Agriculture, Dongying* 257347; 3. *Yellow River Delta Research Institute of Saline-Alkaliland Agriculture, Dongying* 257347; 4. *Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing* 100193; 5. *Institute of Industrial Crops, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan* 250100)

Abstract: 【Objective】 Respiratory burst oxidase homologs (RBOHs) are key rate-limiting enzymes that generate reactive oxygen species (ROS) in plants and play critical roles in stress responses. This study aims to investigate the regulatory characteristics of *SmRBOHs* under salt stress and their effects on active ingredient accumulation, thereby providing a theoretical basis for further functional analysis of *SmRBOHs* and for elucidating the molecular mechanisms underlying active component accumulation in *Salvia miltiorrhiza*. 【Method】 Using *Arabidopsis thaliana* RBOH protein sequences as a reference, we systematically identified members of the *SmRBOH* gene family, comprehensively analyzed their sequence characteristics, evolutionary relationships, and promoter *cis*-elements and transcription factor binding sites, and

收稿日期：2026-05-26
基金项目：青岛市科技局创新源头计划项目（19-6-2-36-cg），山东省中草药产业技术体系建设项目（SDAIT-20），生境种植园建设项目（横20250192），黄河三角洲盐碱地研究院专项（1126001）
*通信作者：江绪文 mjxw888@163.com

constructed a protein-protein interaction network. Transcriptome data were then used to screen for *SmRBOHs* co-expressed with genes involved in the biosynthetic pathways of salvianolic acids and tanshinones. Under salt stress treatments, real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and other techniques were applied to analyze the correlations between *SmRBOH* expression levels, ROS content, and the accumulation of salvianolic acids and tanshinones.【Result】A total of six *SmRBOHs* were identified and classified into three subgroups based on phylogenetic analysis. Their promoter regions contained abundant *cis*-elements associated with abiotic stresses such as salt stress and abscisic acid (ABA), as well as transcription factor binding sites. The *SmRBOHs* exhibited tissue-specific expression patterns and differential responses to ABA. Additionally, these genes were co-expressed with key genes involved in the biosynthetic pathways of salvianolic acids and tanshinones. Under salt stress, the *SmRBOH* members displayed distinct expression patterns. Among them, *SmRBOH2* expression was negatively correlated with H_2O_2 and tanshinone contents, but positively correlated with salvianolic acid accumulation. The other members showed opposite trends.【Conclusion】*SmRBOHs* are widely involved in hormone-mediated physiological regulation and salt stress responses in *S. miltiorrhiza*, and their transcriptional expression is modulated by various transcription factors. *S. miltiorrhiza* may regulate the biosynthesis of salvianolic acids and tanshinones through the ABA-mediated SnRK2-RBOH signaling module, thereby participating in adaptive responses to salt stress.

Keywords: *Salvia miltiorrhiza*; *RBOH* gene family; salt stress; expression pattern; salvianolic acids; tanshinones; H_2O_2; correlation analysis

活性氧（reactive oxygen species, ROS）是植物体内调控生长发育与逆境响应的核心信号分子，主要包括超氧阴离子（O_2^-）、过氧化氢（H_2O_2）、羟基自由基（·OH）和单线态氧（$^1O_2$），具有显著的浓度依赖性双重功能[1]。正常生理条件下，低浓度的ROS可作为关键信号分子，介导植物生长发育和胁迫适应；而盐碱、干旱等逆境胁迫会打破ROS生成与清除的稳态平衡，造成ROS过量累积，引发脂质过氧化、核酸与蛋白质损伤等氧化毒害，抑制植株生长[1-3]。呼吸爆发氧化酶同源物（respiratory burst oxidase homologs, RBOHs）是调控ROS产生的关键因子，广泛参与植物生长发育和抗逆响应[4]，是当前植物逆境分子生物学的研究热点。

丹参（*Salvia miltiorrhiza* Bunge）为唇形科多年生草本植物，以干燥根及根茎入药，是我国传统大宗中药材。2025年版《中国药典》载明该药可活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈，临床多用于冠心病、心脑血管疾病及慢性肾病的防治[5]。苯丙素类的丹酚酸B和二萜类的丹参酮Ⅰ、隐丹参酮和丹参酮ⅡA是丹参的核心药效成分，直接决定药材品质与市场价值[6]。随着中医药产业国际化发展，丹参的市场需求持续增长。我国耕地资源有限，盐碱地作为重要后备耕地资源，总面积达9 913万hm^2[7]。盐碱胁迫会引起离子毒害、渗透胁迫和氧化损伤等，抑制中药材正常生长[8]，但也能改变其次生代谢途径，促进酚类、黄酮、生物碱等药效成分的合成与积累，从而提升药材品质[9]。科学开展盐碱地中药材种植，可在严守粮食安全底线的前提下充分挖掘后备盐碱地的农业利用价值，推动特色中药材产业提质增效、绿色发展。因此，深入研究盐碱胁迫下丹参抗逆适应与品质形成的分子机制，可为盐碱地丹参规范化栽培、盐碱资源绿色高效利用提供理论支撑，兼具重要的科学理论价值与产业实践意义。

近年来，大量研究证实*RBOH*家族基因通过介导ROS信号通路广泛参与农作物和园艺植物的生长发育和胁迫应答。水稻（*Oryza sativa* L.）中多个*RBOH*基因可调控植株生长及其抗旱、耐热及重金属胁迫响应[10-12]；黄瓜（*Cucumis sativus* L.）、南瓜（*Cucurbita moschata*）等作物*RBOH*家族成员正向调控耐盐、耐寒性[13-14]；梨（*Pyrus bretschneideri*）、莴苣（*Lactuca sativa*）、棉花（*Gossypium hirsutum* L.）等植物的*RBOH*基因参与生殖发育、种子萌发与抗病防御[15-17]。丹参相关研究表明，其可耐受轻、中度盐碱胁迫，盐胁迫对其生长发育与次生代谢具有双向调控作用[18-19]，且丹参在黄河三角洲盐碱地的规模化栽培技术已完成初步探索与应用[20-21]，为盐碱地丹参产业化种植奠定了基础。但药用植物*RBOH*家族功能研究仍较为薄弱。丹参*RBOH*家族基因的特征与功能尚不明确，丹参如何通过*RBOH*介导ROS信号通路、协同调控盐胁迫响应及活性成分积累的分子机制尚未解析，制约了丹参抗逆分子育

种与优质栽培机制的深入研究。

本研究以丹参为研究对象，基于现有基因组数据开展*SmRBOHs*基因的全基因组鉴定，并结合转录组数据与RT-qPCR技术探究该家族基因在盐胁迫下的表达模式及其与ROS代谢、丹酚酸及丹参酮积累的关联，以期为揭示丹参*RBOHs*基因功能、阐明其在丹参活性成分积累中的调控机制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

丹参（*S. miltiorrhiza*）种子（安国市农泰中药材种植有限公司）、营养土（寿光益先都农业科技有限公司）、氯化钠（天津市巴斯夫化工有限公司）；Trelief®RNAprep Pure Plant Plus总RNA试剂盒（富含多糖和多酚）、SynScript®III RT SuperMix for qPCR反转录试剂盒和ArtiCan^{CEO} SYBR qPCR Mix荧光定量PCR试剂盒由北京擎科生物科技股份有限公司提供。仪器包括QuantStudio™ 1 Plus实时荧光定量PCR仪（Applied Biosystems）、高效液相色谱仪（1260 Infinity II3030623, Agilent, USA）和Amethyst C_{18}-H柱（250 mm×4.6 mm，粒径5 μm）。

1.2 方法

1.2.1 *SmRBOHs*鉴定与理化性质分析 通过TBtools-II软件的BLAST同源比对[22]，将拟南芥（*Arabidopsis thaliana* L.）RBOH蛋白序列（源于Phytozome数据库，https://phytozome-next.jgi.doe.gov/）与国家基因组科学数据中心（NGDC，https://ngdc.cncb.ac.cn/）的丹参基因组数据库DSS3 v1.0进行序列比对[23]，筛选SmRBOH候选蛋白序列。使用NCBI CDD在线工具（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi）进行保守结构域鉴定，确认目标蛋白。随后，利用ExPASy在线工具（https://web.expasy.org/protparam/）分析SmRBOH蛋白的基本理化特征，包括蛋白质长度、分子量、等电点和疏水性总平均值。最后，通过WoLF PSORT在线工具（https://wolfpsort.hgc.jp/）预测SmRBOH蛋白的亚细胞定位。

1.2.2 *SmRBOH*基因家族保守基序与基因结构分析 通过MEME在线网站（https://meme-suite.org/meme/）对SmRBOH蛋白序列进行保守基序分析，参数设置如下：序列位点分布模式设为0或1，基序宽度范围为6-50个氨基酸，其余参数采用默认设置；保守基序结果使用TBtools-Ⅱ软件进行可视化[22]。基因结构的注释与可视化则利用GSDS 2.0在线工具（https：//gsds.gao-lab.org/）完成。

1.2.3 SmRBOHs系统发育树分析 采用MEGA 5.1软件的最大似然法（maximum likelihood estimate, MLE），基于番茄（*Solanum lycopersicum* L.）、拟南芥、水稻（*Oryza sativa* L.）、墨西哥鼠尾草（*Salvia divinorum* L.）和黄芩（*Scutellaria baicalensis* Georgi）的RBOH蛋白序列（源于NCBI数据库、Phytozome数据库和NGDC数据库）以及SmRBOH蛋白序列，构建系统发育树。最终，通过iTOL在线网站（https://itol.embl.de/）对进化树进行美化与可视化处理。

1.2.4 *SmRBOHs*启动子顺式作用元件和转录结合位点分析 提取*SmRBOHs*起始密码子上游1 500 bp的启动子序列，使用PlantCARE在线工具（http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/）进行顺式作用元件预测。随后，利用TBtools-II软件对结果进行可视化[22]。此外，通过PlantRegMap在线分析平台（http://plantregmap.gao-lab.org/）鉴定启动子区域的转录因子结合位点（筛选阈值设为*P*-value<e^{-5}且*q*-value<0.1）。

1.2.5 蛋白质互作网络分析与分子对接 SnRK2在ABA信号转导中发挥关键调控作用；MAPK参与调控植物对盐胁迫、干旱、温度等多种逆境的应答反应[24-25]。根据已有研究基础[25-26]，本研究利用STRING在线数据库（https://cn.string-db.org/）对6个SmRBOHs、6个SmSnRK2s和18个SmMAPKs进行蛋白质互作网络分析。所得目的序列经Swiss-model在线网站（https://swissmodel.expasy.org/）进行三级结构预测，生成的pdb文件经GRAMM在线软件（https://gramm.compbio.ku.edu/）分子对接后用Pymol软件[27]可视化。

1.2.6 *SmRBOHs*表达分析 利用丹参根、茎、叶和花的转录组数据（PRJNA744957），分析*SmRBOHs*在不同器官中的表达模式。采用RPKM法估算转录本的表达丰度（RPKM≥1则认为有效表达）。使用TBtools-II软件绘制基因表达热图[22]。此外，利用经脱落酸（ABA，50 μmol/L）处理0.5、1、2、4和8 h的丹参根转录组数据（SRP307198），以未处理组为

对照，分析*SmRBOHs*对ABA处理的响应。最后，利用BMKCloud云服务器中的共表达模式聚类分析（http://www.biocloud.net/），对响应ABA的*SmRBOH*与丹酚酸和丹参酮的生物合成途径基因进行共表达模式分析。

1.2.7　丹参幼苗盐胁迫处理　选取饱满均匀、大小一致的丹参种子，将其播种于铺有两层湿润滤纸的培养皿中，随后置于光照培养箱内培养，培养条件为25 ℃、16 h光照/8 h黑暗交替。待种子萌发后，转移至营养土中继续培养；当幼苗生长至4叶期时，移栽至装有混合沙土（沙与营养土体积比1∶1）的花盆中（上口径16 cm、下口径12 cm、高15 cm）。将移栽后的幼苗置于温室中培养（25 ℃、16 h光照/8 h黑暗交替），30 d后进行盐胁迫处理。处理如下：（1）浇灌等量去离子水作为对照，分别在幼苗生长0、1和7 d时取根样；（2）单次浇灌等量200 mmol/L NaCl溶液，于幼苗生长1 d时取根样；（3）分别在第1天和第4天两次浇灌等量200 mmol/L NaCl溶液，于幼苗生长7 d时取根样。以上试验3次重复，样品-80 ℃保存备用。

1.2.8　RT-qPCR分析　使用Trelief®RNAprep Pure Plant Plus试剂盒提取样品总RNA，通过琼脂糖凝胶电泳评估RNA完整性。采用超微量分光光度计（Epoch，BioTek）定量RNA浓度。使用SynScript®III RT SuperMix for qPCR合成cDNA，并用ArtiCan^{CEO} SYBR qPCR Mix构建反应体系，内参基因为*SmActin*，*SmRBOHs*特异性引物见附表1；反应总体积为20 μL，模板体积为1 μL，用QuantStudio™ 1 Plus实时荧光定量PCR仪进行扩增，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法进行定量分析[28]。

1.2.9　H_2O_2含量检测　将0.15 g样品置于冰浴中，用5 mL 0.1%（w/v）三氯乙酸均质化处理。随后10 000 × *g*下离心10 min，取上清液0.5 mL，与0.5 mL 10 mmol/L磷酸钾缓冲液（pH 6.8）和1 mL 1 mol/L的碘化钾溶液混合[29]。在黑暗中反应20 min后，测定上清液在390 nm波长下的吸光度。

1.2.10　丹参酮和丹酚酸含量检测　将根样品在50 ℃下烘干至恒重，取样品粉末（0.1 g）用1 mL 80%甲醇超声提取20 min，随后10 000 × *g*下离心5 min，收集上清液。再用1 mL 80%甲醇重复上述过程，合并上清液，经0.22 μm微孔滤膜过滤至样品瓶中。代谢物通过高效液相色谱（1260 Infinity II3030623, Agilent, USA）进行定量，配备Amethyst C_{18}-H柱（250 mm × 4.6 mm，粒径5 μm）。柱温为25 ℃。流动相由含0.1%（v/v）乙酸的水相（A）和100%乙腈（B）组成。在281 nm波长、1.2 mL/min流速下等度洗脱检测丹酚酸[30]；在270 nm波长、1 mL/min流速下梯度洗脱检测丹参酮，梯度洗脱如下：0–5 min，50% A；5–28 min，50%–30% A；28–30 min，30% A；30–30.5 min，30%–50% A；30.5–32.5 min，50%–40% A；32.5–34.5 min，40%–30% A；34.5–36.5 min，30% A；36.5–37 min，30%–50% A；37–45 min，50% A。

1.2.11　统计分析　利用Excel对数据进行整理；采用SPSS 11.0软件进行独立样本*t*检验和相关性分析。

2　结果

2.1　*SmRBOH*基因家族成员鉴定及其蛋白保守基序

BLAST同源比对后，去除过短、重复及冗余转录本，从丹参基因组数据库获得6个候选序列。为验证这些序列的家族特异性，进一步利用NCBI Batch-CDD在线工具进行保守结构域分析。结果表明，这6个候选序列均含有RBOH家族特征的保守结构域：NADPH_Ox、NAD_binding_6、FAD_binding_8、Ferric_reduct和EF-hand_7（图1-A）。综合分析，最终在丹参基因组中成功鉴定出6个*SmRBOHs*，依次命名为*SmRBOH1*–*SmRBOH6*。

SmRBOHs蛋白共包含11个保守基序，命名为Motif 1–Motif 11，且所有SmRBOHs均包含这11个完整的保守基序（图1-B）。其中，Motif11位于保守结构域NADPH_Ox，Motif7位于EF-hand_7结构域，Motif3、Motif4、Motif8和Motif9位于Ferric_reduct结构域，Motif2和Motif10位于FAD_binding_8结构域，Motif1、Motif5和Motif6位于NAD_binding_6结构域。*SmRBOHs*基因的内含子数量为9–13个，相应的外显子数量为10–14个。家族成员间内含子长度存在明显差异：*SmRBOH1*和*SmRBOH3*的内含子数量相同且长度较长；*SmRBOH2*的内含子数量最少，而*SmRBOH4*与*SmRBOH5*的内含子数量最多且长度适中；*SmRBOH6*的内含子数量为11个，长度最短（图1-C）。

2.2　SmRBOHs的理化特性及亚细胞定位分析

SmRBOHs的氨基酸数量差异显著，介于SmR-

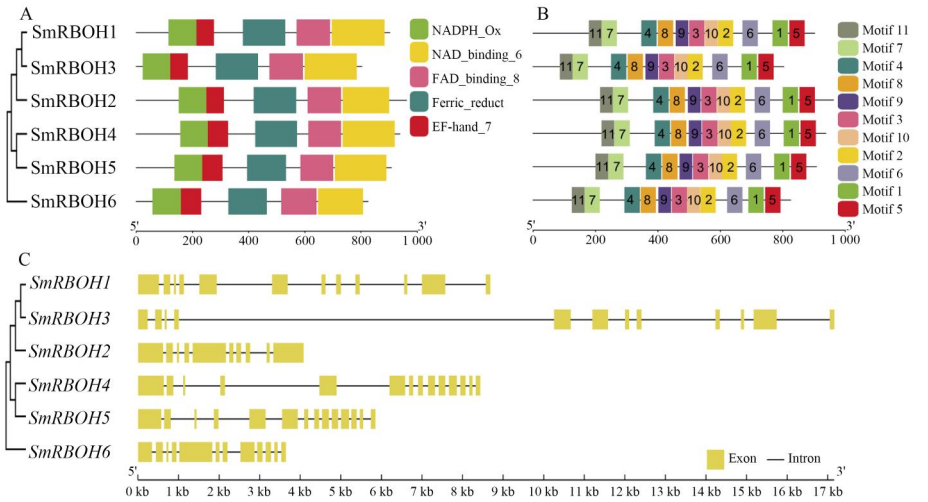


图1 *SmRBOHs*的保守结构域（A）、基因基序（B）和基因结构（C）

Fig. 1 Conserved domain (A), gene motif (B), and gene structure (C) of *SmRBOHs*

BOH3的803个和SmRBOH2的962个之间，分子量范围为90.864-108.295 kD。所有SmRBOH蛋白的等电点（pI）值均大于8，表明该家族蛋白均为碱性蛋白。家族内蛋白稳定性存在差异，蛋白不稳定性指数波动范围为40.69（SmRBOH2）-49.76（SmRBOH4）。疏水指数波动范围为78.58（SmRBOH6）-88.22（SmRBOH4）。所有SmRBOHs均为亲水性蛋白，其中SmRBOH5的GRAVY（grand average of hydropathicity）值最大（-0.119），亲水性最弱（附表2）。该家族蛋白定位多样，分布于质膜、内质网、细胞核、细胞质基质、叶绿体和液泡等部位。各成员定位特征存在差异：所有SmRBOHs均定位于质膜；此外，SmRBOH4和SmRBOH5还分布于细胞核；SmRBOH1、SmRBOH2、SmRBOH5和SmRBOH6还分布于内质网，其中SmRBOH5还分布于叶绿体和液泡，SmRBOH6还分布于细胞质基质和液泡（附表3）。

2.3 *SmRBOHs*系统进化分析

为阐明SmRBOHs系统发育特征，对丹参、拟南芥、水稻、番茄、黄芩和墨西哥鼠尾草等6个物种的61个RBOH蛋白全长序列进行比对，并构建了系统发育树（图2）。结果显示，所有RBOH蛋白可划分为3个亚组，每个亚组都包含这6个物种：G1组含14个成员，包括SmRBOH6；G2组含23个成员，包括SmRBOH4和SmRBOH5；G3组含24个成员，包括SmRBOH1、SmRBOH2和SmRBOH3。同源性分

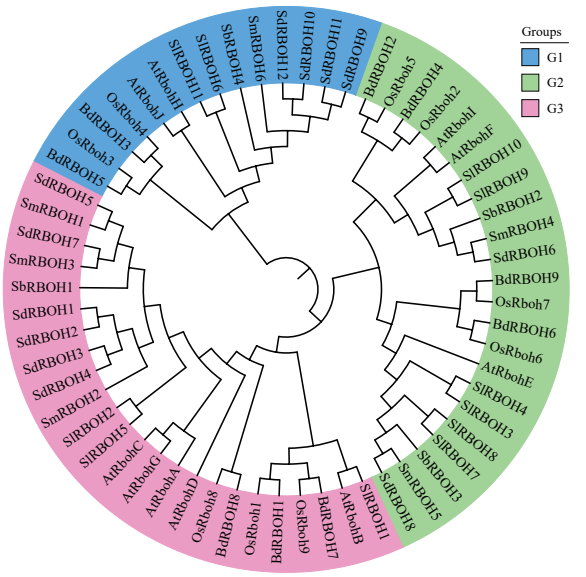


图2 丹参、拟南芥、水稻、番茄、黄芩和墨西哥鼠尾草RBOH蛋白的系统进化关系

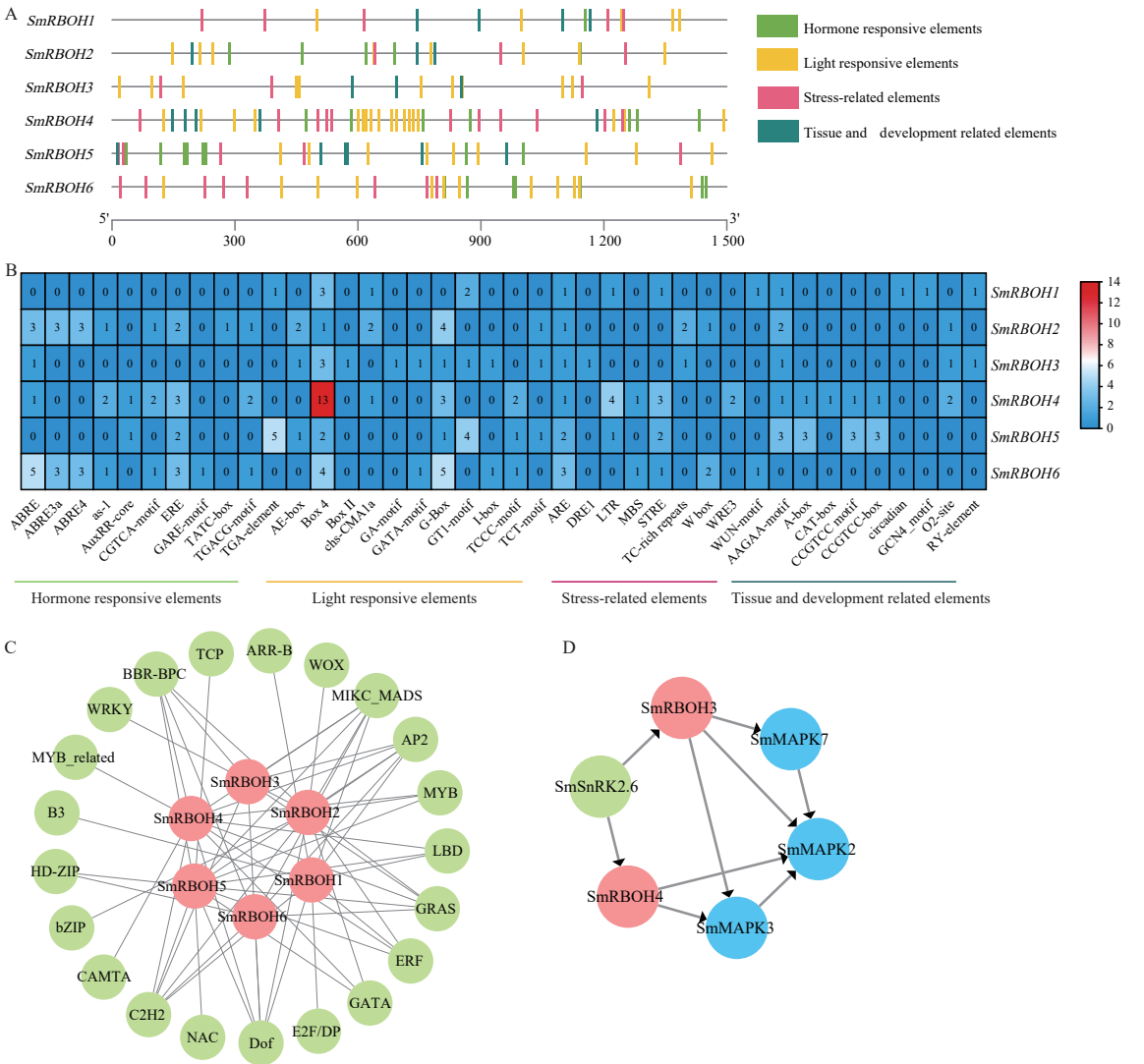
Fig. 2 Phylogenetic relationships of RBOH proteins from *Salvia miltiorrhiza*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Solanum lycopersicum*, *Scutellaria baicalensis*, and *Salvia divinorum*

析表明，SmRBOHs内部亲缘关系最近的成对成员为SmRBOH1与SmRBOH3、SmRBOH2与SmRBOH3。从整体来看，墨西哥鼠尾草RBOH蛋白（SdRBOH）和黄芩RBOH蛋白（SbRBOH）与SmRBOHs的亲缘

关系最为密切，它们可能具有相似的功能，这与它们同为唇形科植物的分类一致。

2.4　*SmRBOHs*启动子顺式作用元件及转录结合位点分析

顺式元件分析表明，*SmRBOHs*启动子除含TATA-box、CAAT-box基础元件外，还分布大量光、激素、逆境及生长发育响应元件（图3-A）。光响应元件中，*SmRBOH4*富集数量最多，是光信号调控的关键成员。该家族启动子涵盖六大类激素应答元件，以ABA响应元件最为丰富。所有*SmRBOHs*均具备激素响应特性，其中*SmRBOH6*激素元件最多，可受多种激素协同调控。同时，*SmRBOHs*含有多种干旱、低温、氧化及病原菌胁迫响应元件，各基因至少含3类该响应元件，*SmRBOH4*胁迫元件数量最多，在丹参逆境适应中发挥重要作用。此外，该家族多成员携带生长发育相关元件，仅*SmRBOH6*缺失此类元件，*SmRBOH5*含该类元件数量最多，说明*SmRBOHs*不仅参与逆境与激素响应，还广泛调控丹参生长发



A：顺式作用元件类型；B：顺式作用元件数量；C：转录因子结合位点；D：蛋白互作分析

A: Types of *cis*-acting elements. B: Numbers of *cis*-acting elements. C: Transcription factor binding sites. D: Protein-protein interaction analysis

图3　*SmRBOHs*顺式作用元件及转录因子结合位点和蛋白互作分析

Fig. 3　Analysis of *cis*-acting elements, transcription factor binding sites, and protein-protein interactions of the *SmRBOHs*

育等生命过程（图3-B）。

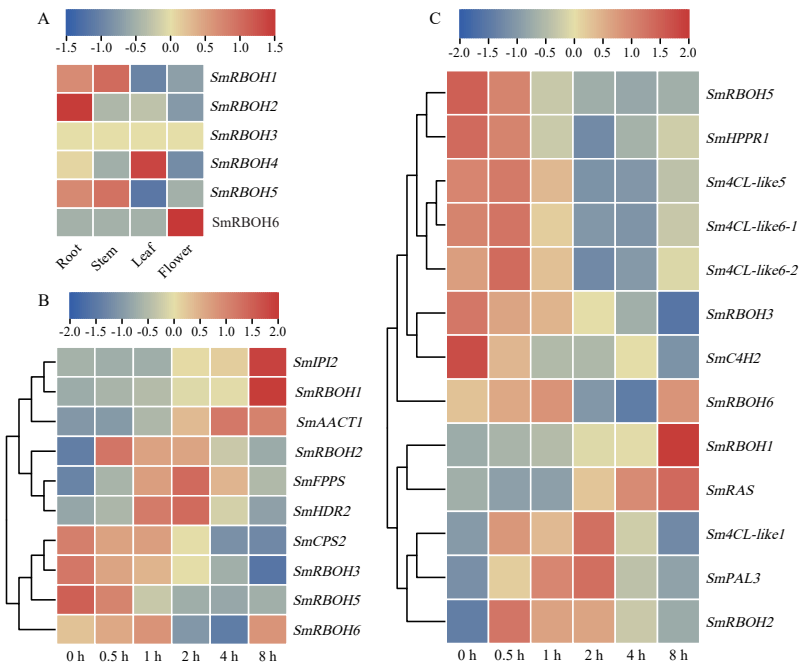
在*SmRBOH*s启动子区共鉴定出21类转录因子结合位点（图3-C），且所有*SmRBOH*s均存在转录因子结合位点，但不同成员的结合位点数量不同。*SmRBOH5*有13个；*SmRBOH2*与*SmRBOH4*各有12个；*SmRBOH1*、*SmRBOH6*和*SmRBOH3*分别有9、7和6个。从转录因子家族分布特征看，不同*SmRBOH*s具有的转录因子结合位点类型不同，如AP2、C2H2、Dof和MIKC_MADS类转录因子普遍存在于所有*SmRBOH*s中，这些转录因子可能对该基因家族表达具有普遍调控作用；而BBR-BPC和GRAS存在于除*SmRBOH1*外的5个基因中，TCP和NAC专属*SmRBOH5*；HD-ZIP则仅分布于*SmRBOH5*与*SmRBOH6*，这些转录因子对家族基因的调控可能具有特异性。

2.5 SmRBOHs互作分析

结合*SmRBOH*s启动子区ABA响应元件分布特征，以及植物逆境中SnRK2和MAPK激酶介导ABA信号与ROS调控的保守研究背景，进一步分析丹参RBOH潜在互作蛋白。利用STRING软件构建的蛋白质互作网络显示，2个SmRBOHs（SmRBOH3和SmRBOH4）与1个SmSnRK2（SmSnRK2.6）和3个SmMAPKs（SmMAPK2、SmMAPK3和SmMAPK7）存在潜在蛋白互作（图3-D）。进一步分子对接结果显示，SmRBOH3和SmRBOH4分别与SmSnRK2.6和SmMAPKs（SmMAPK2、SmMAPK3和SmMAPK7）蛋白之间均存在多个相互作用的氨基酸残基位点（附图1），这些蛋白质借助氨基酸残基发生相互作用，组装形成复合物，进而改变自身生物活性，发挥协同效应。

2.6 *SmRBOH*s表达模式分析

为探讨*SmRBOH*s在丹参生长发育中的作用，本研究分析其在根、茎、叶和花中的表达情况（图4-A）。结果显示，*SmRBOH1*、*SmRBOH2*、*SmRBOH4*和*SmRBOH5*在4个组织中均有表达，其中*SmRBOH2*在根中表达最高，*SmRBOH1*和*SmRBOH5*在根和茎中表达较高，*SmRBOH4*在根和叶中表达较高，



A：*SmRBOH*s在不同组织中的表达；B：*SmRBOH*s与丹参酮生物合成途径基因响应ABA的共表达模式；C：*SmRBOH*s与丹酚酸生物合成途径基因响应ABA的共表达模式

A: Expression of *SmRBOH*s in different tissues. B: Co-expression pattern of *SmRBOH*s and genes involved in the biosynthesis pathway of tanshinone in response to ABA. C: Co-expression pattern of *SmRBOH*s and genes involved in the biosynthesis pathway of salvianolic acid in response to ABA

图4 *SmRBOH*s表达模式

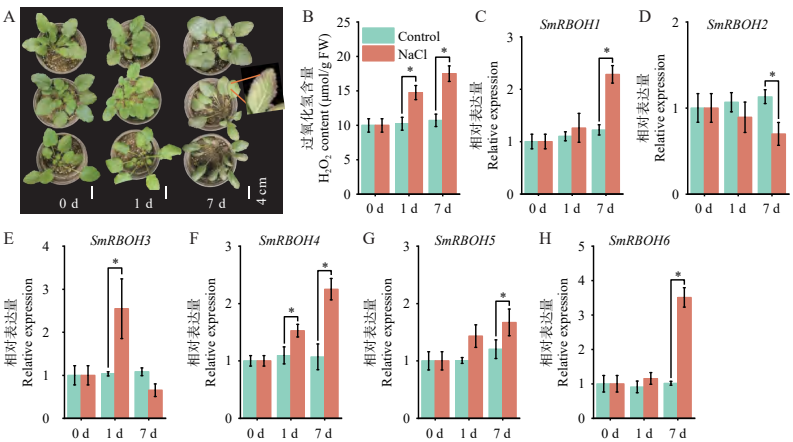
Fig. 4 Expression patterns of *SmRBOH*s

这些基因与丹参根的生长发育及药材形成可能密切相关；*SmRBOH3*在4个组织中未检测到，*SmRBOH6*则在花中表达量最高，在根、茎和叶中很难检测到。

在*SmRBOH*基因的启动子区域，ABA响应元件数量最多。为探讨*SmRBOH*在丹参酮和丹酚酸合成中的作用，将ABA处理0（对照）、0.5、1、2、4和8 h的丹参毛状根转录组数据与*SmRBOHs*和丹参酮与丹酚酸的生物合成途径基因进行共表达模式分析。结果表明，至少有一个处理的*SmRBOH1*、*SmRBOH2*、*SmRBOH3*、*SmRBOH5*和*SmRBOH6*与对照相比，存在差异表达；从表达变化趋势看，*SmRBOH1*和*SmRBOH2*上调，*SmRBOH3*和*SmRBOH5*下调，*SmRBOH6*则先上调、后下调、再上调（图4-B, C）。共表达模式分析进一步表明，这些差异表达基因与8个丹酚酸生物合成途径基因及5个丹参酮生物合成途径基因聚集在一起（图4-B, C），可见这些*SmRBOHs*基因可能调控丹参活性成分的生物合成。

2.7　NaCl胁迫下丹参根系H_2O_2含量及*SmRBOHs*表达分析

与未处理组（对照）相比，NaCl处理1 d和7 d时，随处理天数增加，植株叶缘出现紫色、根系H_2O_2含量分别增加了47.65%和75.34%（图5-A, B）。NaCl处理1 d时，除*SmRBOH2*外，其余家族成员的表达均上调，且*SmRBOH3*和*SmRBOH4*达到显著水平。NaCl处理7 d时，*SmRBOH1*、*SmRBOH4*、*SmRBOH5*和*SmRBOH6*的表达均显著上调，*SmRBOH2*表达显著下调，而*SmRBOH3*表达无显著下调（图5-C–H）。



A–B：盐处理的丹参盆栽苗（A）和根系H_2O_2含量（B）；C–H：盐处理的丹参根系*SmRBOHs*的相对表达量。*P<0.05，下同

A–B: *S. miltiorrhiza* pot seedlings (A) and root H_2O_2 content (B) under salt stress. C–H: Relative expression of *SmRBOHs* in roots of salt-treated *S. miltiorrhiza* seedlings. *P<0.05. The same below

图5　盐胁迫下丹参盆栽苗表型、根系H_2O_2含量和*SmRBOHs*表达特征

Fig. 5　Phenotypes of pot seedlings, root H_2O_2 content, and *SmRBOHs* expression of *S. miltiorrhiza* under salt stress

2.8　盐胁迫下丹参根系丹酚酸和丹参酮含量分析

与未处理组（对照）相比，盐处理1 d时，丹参根中丹酚酸A、丹酚酸B和迷迭香酸含量均降低、而咖啡酸含量增加，其中丹酚酸B和迷迭香酸的变化达到显著水平。盐处理7 d时，丹酚酸A、丹酚酸B、咖啡酸和迷迭香酸含量均显著降低（图6-A）。此外，与对照相比，NaCl处理1 d和7 d，丹参根中二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮IIA含量均增加，其中处理1 d时，二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮IIA含量显著增加；处理7 d时，仅隐丹参酮和丹参酮IIA含量显著增加（图6-B）。

2.9　相关性分析

为明确基因表达水平与次生代谢产物之间的相关性，对15个指标进行Spearman分析（图7）。结果显示，H_2O_2含量与*SmRBOH1*、*SmRBOH3*、*SmRBOH4*、*SmRBOH5*和*SmRBOH6*表达呈正相关，且与*SmRBOH1*、*SmRBOH4*、*SmRBOH5*和*SmRBOH6*达极显著水平；与*SmRBOH2*表达呈极显著负相关；与迷

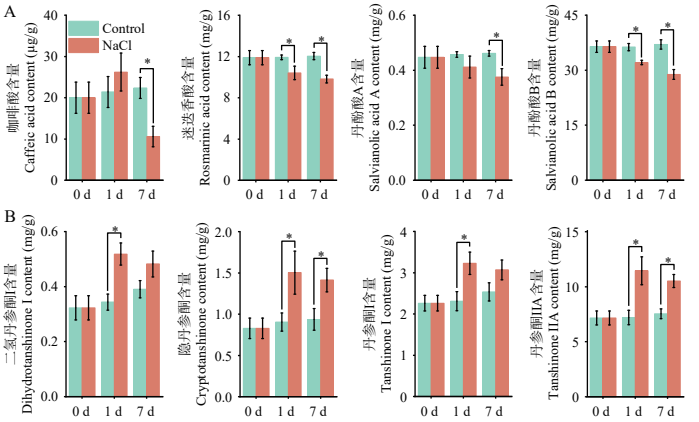
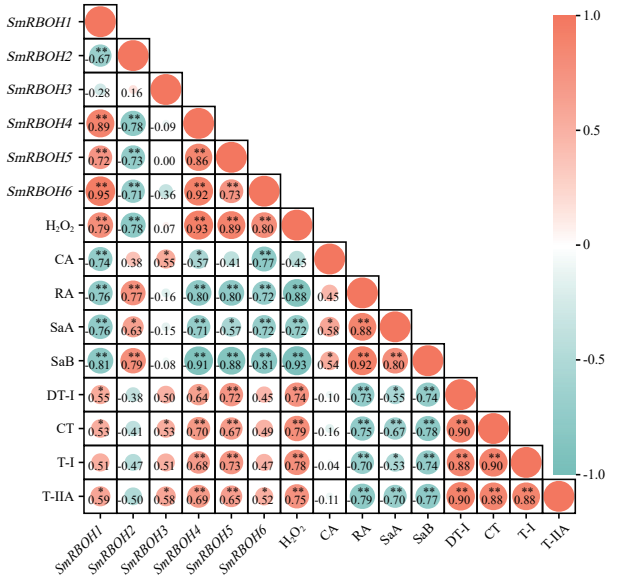


图6 盐胁迫对丹参根系丹酚酸(A)和丹参酮(B)含量的影响

Fig. 6 Effect of salt stress on the contents of salvianolic acid (A) and tanshinone (B) in the roots of *S. miltiorrhiza*



CA:咖啡酸;RA:迷迭香酸;SaA:丹酚酸A;SaB:丹酚酸B;DT-I:二氢丹参酮I;CT:隐丹参酮;T-I:丹参酮I;T-IIA:丹参酮IIA。**P<0.01

CA: Caffeic acid. RA: Rosmarinic acid. SaA: Salvianolic acid A. SaB: Salvianolic acid B. DT-I: Dihydrotanshinone I. CT: Cryptotanshinone. T-I: Tanshinone I. T-IIA: Tanshinone IIA. **P<0.01

图7 不同处理丹参根系*SmRBOHs*表达水平与H_2O_2含量、丹酚酸含量和丹参酮含量的相关性分析

Fig. 7 Correlation analysis of *SmRBOHs* expression in roots of *S. miltiorrhiza* under different treatments with H_2O_2, salvianolic acid, and tanshinone contents

迭香酸、丹酚酸A和丹酚酸B含量呈极显著负相关;与二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮IIA含量呈极显著正相关。此外,*SmRBOH1*、*SmRBOH3*、*SmRBOH4*、*SmRBOH5*和*SmRBOH6*的表达水平与二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮IIA含量均呈正相关,且与丹参酮IIA含量达显著或极显著水平。*SmRBOH1*、*SmRBOH4*、*SmRBOH5*和*SmRBOH6*的表达水平与咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸A和丹酚酸B含量呈负相关,且*SmRBOH1*、*SmRBOH4*和*SmRBOH6*与这些酚酸含量呈显著或极显著负相关,*SmRBOH5*与迷迭香酸、丹酚酸A和丹酚酸B显著或极显著负相关,而*SmRBOH2*与迷迭香酸和丹酚酸B呈极显著正相关,与二氢丹参酮I、隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮IIA含量呈负相关。

3 讨论

本研究从丹参基因组鉴定出6个*SmRBOHs*,成员数量与葡萄(*Vitis vinifera* L.)和火炬松(*Pinus taeda*)等植物一致,而与大豆(*Glycine max*)、玉米(*Zea mays* L.)、小麦(*Triticum aestivum* L.)等农作物差异明显[31],可能与物种特性和基因组大小有关。SmRBOHs主要定位于质膜与内质网,基因结构、外显子数量和保守结构域均与拟南芥、水稻、番茄等植物RBOH家族高度一致,表明其序列和功能较为保守[31-35]。进化分析显示,SmRBOHs与唇形科近缘物种亲缘关系最近,进化特征与物种分类地位相符。组织表达分析显示,多数*SmRBOHs*在根部优势表达,部分基因呈组织特异表达或沉默特征,该表达模式在多种植物中高度保守[32, 35]。

顺式作用元件在基因表达中发挥重要调控功

能[36]。*SmRBOHs*启动子富含多种激素与逆境响应顺式元件，不同家族成员响应激素类型有差异，同时分布着低温、干旱、抗氧化、防御应激、损伤响应元件，表明该家族基因可响应激素与环境胁迫信号。RNA-seq分析表明，ABA处理可显著改变*SmRBOHs*的表达模式，各成员呈上调、下调、波动表达的差异化特征，与启动子含ABA响应元件的特征相符。共表达聚类显示，差异表达的*SmRBOHs*与丹酚酸、丹参酮生物合成基因密切关联，预示其参与调控丹参活性成分累积，与ABA促进丹参酮和丹酚酸生物合成的报道相吻合[37]。再者，盐胁迫可诱导丹参根部多个*SmRBOHs*，并伴随H_2O_2含量升高，表明该家族基因参与盐胁迫下ROS代谢与植株耐盐响应。其中，*SmRBOH3*、*SmRBOH4*可通过ABA介导的SnRK2/MAPK激酶通路参与盐胁迫应答，分子对接也验证了相关蛋白间存在多个氨基酸互作位点，与SnRK2/MAPK介导ABA信号、ROS平衡与RBOH蛋白调控的保守核心激酶通路相一致[38-42]，但该调控机制仍需实验进一步验证。结合其他植物*RBOH*时序性响应盐胁迫的报道[32, 34, 43-44]，本研究结果表明*SmRBOHs*存在明显的功能与表达分化，其中*SmRBOH2*表达与H_2O_2、丹参酮含量负相关，却正向调控丹酚酸积累，与其余家族成员趋势相反。*SmRBOH2*的这种功能或与其基因结构特征相关。再者，转录因子通过特异性结合靶基因启动子上的顺式作用元件来调控基因表达[45]。过表达*SmGRAS5*、*SmDof32*可分别提升丹参盐、旱耐受性并促进丹参酮、丹酚酸合成[46-47]。*SmRBOH3*、*SmRBOH4*除启动子具GRAS、Dof等转录因子结合位点外，还响应盐胁迫并伴随H_2O_2水平和活性成分累积变化。因此，盐胁迫下丹参可通过*SmRBOHs*家族成员的差异化表达，协同平衡ROS，进而构建多层次的耐盐调控网络，为解析药用植物*RBOH*家族基因的功能多样性提供理论依据。

已有研究显示，水培条件下≤100 mmol/L NaCl对丹参幼苗生长形态影响有限，但对干物质积累抑制显著[48]；本课题组前期盆栽试验表明，100[19]和200 mmol/L NaCl均可显著抑制丹参幼苗生长。本研究重点解析盐胁迫中后期应答，200 mmol/L NaCl可有效诱导盐胁迫响应及次生代谢变化。同时，单一盐浓度处理解析基因功能与代谢响应的策略已被广泛用于药用植物逆境研究[18, 49-50]。故本研究采用200 mmol/L NaCl来探究中后期盐胁迫下*SmRBOHs*对H_2O_2含量、丹酚酸和丹参酮积累的调控关系，阐明三者间的协同规律，现有结果已达预期研究目标。*RBOH*为逆境早期关键信号基因，短期胁迫下易出现瞬时表达波动，后续将增加胁迫取样梯度，并增加抗氧化、渗透调节、细胞膜稳定性等生理指标测定，系统解析*SmRBOHs*介导丹参耐盐的调控网络。因丹酚酸与丹参酮为鼠尾草属特有代谢产物，拟南芥等模式植物缺乏完整合成通路，难以真实反映*SmRBOHs*对丹参次生代谢的调控作用。后续将利用丹参稳定遗传转化体系开展基因功能验证，进一步揭示*SmRBOHs*参与盐胁迫响应及次生代谢调控的分子机制。

4　结论

鉴定出6个*SmRBOH*s，其序列保守但结构分化明显。其启动子富含激素、逆境响应顺式元件与转录因子结合位点。*SmRBOHs*具组织特异性表达特征，既可与丹酚酸、丹参酮合成基因共表达，又响应盐胁迫，还与H_2O_2含量、丹酚酸与丹参酮积累密切相关；其中SmRBOH3和SmRBOH4可与SmMAPKs及ABA通路因子SmSnRK2.6潜在互作。

文章所有附图附表请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260910091806_NewsFile_60.pdf）。

参考文献

[1] Wang PT, Liu WC, Han C, et al. Reactive oxygen species: Multidimensional regulators of plant adaptation to abiotic stress and development [J]. J Integr Plant Biol, 2024, 66(3): 330-367.

[2] Mittler R, Zandalinas SI, Fichman Y, et al. Reactive oxygen species signalling in plant stress responses [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022, 23(10): 663-679.

[3] Shabbir R, Javed T, Sun SR, et al. Reactive oxygen species-(ROS) in plant defense: jack-of-all-trades [J]. Crit Rev Biotechnol, 2026, 46(1): 152-160.

[4] Sun LR, Zhao ZJ, Hao FS. NADPH oxidases, essential players of hormone signalings in plant development and response to stresses [J]. Plant Signal Behav, 2019, 14(11): 1657343.

[5] Su CY, Ming QL, Rahman K, et al. *Salvia miltiorrhiza*: Traditional

medicinal uses, chemistry, and pharmacology [J]. Chin J Nat Med, 2015, 13(3): 163-182.

[6] Yang L, Huang XL, Wang ZH, et al. Research progress on the pharmacological properties of active ingredients from *Salvia miltiorrhiza*: a review [J]. Phytomedicine, 2025, 148: 157272.

[7] 刘佳欣, 张会龙, 邹荣松, 等. 不同类型盐生植物适应盐胁迫的生理生长机制及Na^+逆向转运研究进展 [J]. 生物技术通报, 2023, 39(1): 59-71.
Liu JX, Zhang HL, Zou RS, et al. Research progress in Na^+ antiport and physiological growth mechanisms of differernt halophytes adapted to salt stress [J]. Biotechnol Bull, 2023, 39(1): 59-71.

[8] 孙良丹. 盐碱地特色中药农业新理念思考与实践 [J]. 华北理工大学学报: 自然科学版, 2024, 46(1): 1-7.
Sun LD. Innovation and practice of new concepts in traditional Chinese medicine agriculture in saline-alkali land [J]. J N China Univ Sci Technol Nat Sci Ed, 2024, 46(1): 1-7.

[9] 黄姚姚, 申俊龙, 李洁. 逆境出质量: 从种质与环境的相互作用探讨道地药材的质量形成机制 [J]. 中草药, 2025, 56(8): 2945-2953.
Huang YY, Shen JL, Li J. Adversity breeds quality: Exploring quality formation mechanism of genuine medicinal materials from interaction between germplasm and environment [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(8): 2945-2953.

[10] Qi JX, Yang SQ, Salam A, et al. OsRbohI regulates rice growth and development via jasmonic acid signalling [J]. Plant Cell Physiol, 2023, 64(6): 686-699.

[11] Wang HQ, Zhao XY, Xuan W, et al. Rice roots avoid asymmetric heavy metal and salinity stress via an RBOH-ROS-auxin signaling cascade [J]. Mol Plant, 2023, 16(10): 1678-1694.

[12] Chen YT, Zhang R, Wang RJ, et al. Overexpression of *OsRbohH* enhances heat and drought tolerance through ROS homeostasis and ABA mediated pathways in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plants, 2024, 13(17): 2494.

[13] Huang Y, Cao HS, Yang L, et al. Tissue-specific respiratory burst oxidase homolog-dependent H_2O_2 signaling to the plasma membrane H^+-ATPase confers potassium uptake and salinity tolerance in Cucurbitaceae [J]. J Exp Bot, 2019, 70(20): 5879-5893.

[14] Di QH, Zhou MD, Li YS, et al. Respiratory burst oxidase homolog 5.1 regulates H3K4me3 deposition and transcription after cold priming in cucumber [J]. Plant Physiol, 2025, 197(2): kiae461.

[15] Zhang H, Liu XY, Tang C, et al. A respiratory burst oxidase homolog protein in *Pyrus* regulates stigmatic ROS production to control pollen tube growth [J]. Plant Physiol, 2025, 198(4): kiaf336.

[16] Yang XQ, Zhang F, Yang M, et al. The NADPH-oxidase LsRbohC1 plays a role in lettuce (*Lactuca sativa*) seed germination [J]. Plant Physiol Biochem, 2020, 154: 751-757.

[17] Huang WT, Zhang YL, Zhou JL, et al. The respiratory burst oxidase homolog protein D (*GhRbohD*) positively regulates the cotton resistance to *Verticillium dahliae* [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (23): 13041.

[18] Chai SY, Yang ZY, Deng XX, et al. ZnO quantum dots alleviate salt stress in *Salvia miltiorrhiza* by enhancing growth, scavenging reactive oxygen species, and modulating stress-responsive genes [J]. Environ Pollut, 2024, 344: 123363.

[19] Li HQ, Zhang JX, Mi XT, et al. Melatonin priming enhances the seed germination and seedling performance of *Salvia miltiorrhiza* under salt stress [J]. Ind Crops Prod, 2026, 242: 122972.

[20] 韩金龙, 张锋, 黄亭亭, 等. 26种药用植物黄河三角洲地区引种适应性评价 [J]. 现代中药研究与实践, 2017, 31(4): 5-7, 16.
Han JL, Zhang F, Huang TT, et al. Evaluation on the adaptability of the introduction of 26 species of medicinal plants in the Yellow River Delta [J]. Res Pract Chin Med, 2017, 31(4): 5-7, 16.

[21] 窦家聪, 邢晓飞, 杨久涛, 等. 不同覆膜材料对黄河三角洲盐碱地丹参生长的影响 [J]. 中国农技推广, 2025, 41(12): 87-89, 96.
Dou JC, Xing XF, Yang JT, et al. Effects of different film mulching materials on the growth of *Salvia miltiorrhiza* in saline-alkali land of the Yellow River Delta [J]. China Agric Technol Ext, 2025, 41 (12): 87-89, 96.

[22] Chen CJ, Wu Y, Li JW, et al. TBtools-II: a "one for all, all for one" bioinformatics platform for biological big-data mining [J]. Mol Plant, 2023, 16(11): 1733-1742.

[23] Zhou CH, Lin CC, Xing PY, et al. SmGDB: genome database of *Salvia miltiorrhiza*, an important TCM Plant [J]. Genes Genom, 2022, 44(6): 699-707.

[24] 张鑫苗, 伍国强, 魏明. MAPK在植物响应逆境胁迫中的作用 [J]. 草业学报, 2024, 33(1): 182-197.
Zhang XM, Wu GQ, Wei M. The role of MAPK in plant response to abiotic stress [J]. Acta Prataculturae Sin, 2024, 33(1): 182-197.

[25] 周颖, 白艳红, 王钰, 等. 丹参*SnRK2*基因家族的鉴定与表达 [J]. 分子植物育种, 2022, 20(7): 2233-2243.
Zhou Y, Bai YH, Wang Y, et al. Genome-wide idenfication and expression pattern analysis of *SnRK2* in *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. Mol Plant Breed, 2022, 20(7): 2233-2243.

[26] Xie YF, Ding ML, Zhang B, et al. Genome-wide characterization and expression profiling of *MAPK* cascade genes in *Salvia miltiorrhiza* reveals the function of SmMAPK3 and SmMAPK1 in secondary metabolism [J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 630.

[27] Rosignoli S, Paiardini A. Boosting the full potential of PyMOL with structural biology plugins [J]. Biomolecules, 2022, 12(12): 1764.

[28] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[29] Yang JW, Ma CL, Jia R, et al. Different responses of two maize cultivars to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae

infestation provide insights into their differences in resistance [J]. Front Plant Sci, 2023, 14: 1065891.

[30] Huang Q, Sun MH, Yuan TP, et al. The AP2/ERF transcription factor SmERF1L1 regulates the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Food Chem, 2019, 274: 368-375.

[31] Zhang HY, Wang X, Yan A, et al. Evolutionary analysis of respiratory burst oxidase homolog (*RBOH*) genes in plants and characterization of *ZmRBOHs* [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(4): 3858.

[32] Wang YH, Liu ZS, Li L, et al. The characteristics and expression analysis of the tomato *SlRBOH* gene family under exogenous phytohormone treatments and abiotic stresses [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(11): 5780.

[33] Du LH, Jiang Z, Zhou YD, et al. Genome-wide identification and expression analysis of respiratory burst oxidase homolog (*RBOH*) gene family in eggplant (*Solanum melongena* L.) under abiotic and biotic stress [J]. Genes, 2023, 14(9): 1665.

[34] Liu MM, Zhang Y, Pan T, et al. Genome-wide analysis of respiratory burst oxidase homolog gene family in pea (*Pisum sativum* L.) [J]. Front Plant Sci, 2023, 14: 1321952.

[35] Kaur G, Pati PK. Analysis of *cis*-acting regulatory elements of respiratory burst oxidase homolog (*Rboh*) gene families in *Arabidopsis* and rice provides clues for their diverse functions [J]. Comput Biol Chem, 2016, 62: 104-118.

[36] Zhang T, Wu AQ, Yue YP, et al. uORFs: important *cis*-regulatory elements in plants [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(17): 6238.

[37] Shi M, Hua Q, Kai GY. Comprehensive transcriptomic analysis in response to abscisic acid in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC, 2021, 147(2): 389-404.

[38] de Zelicourt A, Colcombet J, Hirt H. The role of MAPK modules and ABA during abiotic stress signaling [J]. Trends Plant Sci, 2016, 21(8): 677-685.

[39] Manna M, Rengasamy B, Sinha AK. Revisiting the role of MAPK signalling pathway in plants and its manipulation for crop improvement [J]. Plant Cell Environ, 2023, 46(8): 2277-2295.

[40] Jalmi SK, Sinha AK. ROS mediated MAPK signaling in abiotic and biotic stress- striking similarities and differences [J]. Front Plant Sci, 2015, 6: 769.

[41] Acharya BR, Jeon BW, Zhang W, et al. Open Stomata 1 (OST1) is limiting in abscisic acid responses of *Arabidopsis* guard cells [J]. New Phytol, 2013, 200(4): 1049-1063.

[42] Begum K, Das A, Ahmed R, et al. Genome-wide analysis of respiratory burst oxidase homolog (*Rboh*) genes in *Aquilaria* species and insight into ROS-mediated metabolites biosynthesis and resin deposition [J]. Front Plant Sci, 2023, 14: 1326080.

[43] Wang J, Liu XJ, Kang YD, et al. Functional analysis and interaction networks of Rboh in poplar under abiotic stress [J]. Front Plant Sci, 2025, 16: 1553057.

[44] Pan L, Cai LR, Lu Y, et al. Genome-wide identification and expression analysis *Pvrboh* genes reveal their potential roles in salt tolerance and calcium signaling [J]. Plant Cell Physiol, 2026, 67 (1): 8-19.

[45] Anderssen S, Naômé A, Jadot C, et al. AURTHO: Autoregulation of transcription factors as facilitator of *cis*-acting element discovery [J]. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2022, 1865(5): 194847.

[46] Li WR, Yu JC, Wang RH, et al. Overexpression of SmGRAS5 enhances tolerance to abiotic stresses in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 221: 109669.

[47] Lv BB, Feng QQ, Shao GG, et al. The transcription factor Dof32 coordinates salvianolic acid biosynthesis and drought tolerance in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Plant Physiol, 2025, 198(2): kiaf221.

[48] Zhao GM, Shi QM, Han Y, et al. The physiological and biochemical responses of a medicinal plant (*Salvia miltiorrhiza* L.) to stress caused by various concentrations of NaCl [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89624.

[49] Bi Q, Yao H, Wang F, et al. Integrative analysis of the pharmaceutical active ingredient and transcriptome of the aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* under salt stress reveals liquiritin accumulation via ABA-mediated signaling [J]. Mol Genet Genomics, 2022, 297(2): 333-343.

[50] Zheng FX, Xu ZT, Deng XJ, et al. Comprehensive identification of aquaporins under salt stress, and functional characterization of DoTIP1-1 in *Dendrobium officinale* [J]. Plant Physiol Biochem, 2026, 231: 110952.

（责任编辑　高洁）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):250-256

山西省伞菌目3个中国新记录种

张前达[1] 马晓庆[1] 刘晋涛[1] 常明昌[1, 2] 孟俊龙[1, 2*] 王术荣[1, 2, 3*]
（1.山西农业大学食品科学与工程学院，晋中 030801；2.食用菌种质创新与资源利用山西省重点实验室，晋中 030801；3.江苏安惠生物科技有限公司，南通 226000）

摘 要： 【目的】准确鉴定采自山西省吕梁山和太行山区的3份疑似中国新记录伞菌标本，丰富山西省大型真菌物种多样性。【方法】采用形态学与分子系统学相结合的方法，基于宏观形态和显微结构观察，并结合ITS等多基因序列构建最大似然法和贝叶斯推断系统发育树，综合分析3个物种的系统分类地位。【结果】综合形态与分子数据，确定3个物种分别为祖凯雷利氏粉褶菌（*Entoloma zuccherellii*）、红褐丝盖伞（*Inocybe rufobrunnea*）和斑点滴褶菇（*Staktophyllus guttulatus*），为中国新记录种。系统发育分析结果与形态鉴定高度一致。【结论】首次报道了上述3种伞菌在中国的分布，扩展了其地理分布范围，也为相关类群的生物地理学和演化研究提供了新素材。

关键词： 伞菌目；系统发育分析；形态学分析；新记录
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0344

Three New Chinese Records of Agaricales Species from Shanxi Province, China

ZHANG Qian-da[1] MA Xiao-qing[1] LIU Jin-tao[1] CHANG Ming-chang[1, 2] MENG Jun-long[1, 2*] WANG Shu-rong[1, 2, 3*]
（1. *College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Jinzhong* 030801; 2. *Shanxi Key Laboratory of Edible Fungus Germplasm Innovation and Resource Utilization, Jinzhong* 030801; 3. *Jiangsu Alphay Bio-technology Co., Ltd., Nantong* 226000）

Abstract: 【Objective】To accurately identify three agaric specimens collected from the Lyuliang and Taihang Mountains in Shanxi Province that are suspected to be new records for China, and to enrich the macrofungal species diversity of Shanxi Province. 【Method】A combination of morphological and molecular systematics was employed to determine the taxonomic status of the three species. Based on observations of macro-morphology and microstructural characteristics, and using ITS and other multilocus sequences, maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) phylogenetic trees were constructed for comprehensive analysis. 【Result】Based on comprehensive morphological and molecular data, the three species were identified as *Entoloma zuccherellii*, *Inocybe rufobrunnea*, and *Staktophyllus guttulatus*, which are newly recorded species in China. The phylogenetic analysis results were highly consistent with the morphological identification. 【Conclusion】This study reports the distribution of the three agaric species in China for the first time, expanding their known geographic range and providing new material for biogeographic and evolutionary research on related taxa.

Keywords: Agaricales; phylogenetic analysis; morphological analysis; new records

祖凯雷利氏粉褶菌（*Entoloma zuccherellii*）模式标本采自意大利，于2000年曾以祖凯雷利氏红盖菇*Rhodocybe zuccherellii*这一基原异名发表[1]。2009年，荷兰真菌学家Co-David基于RPB2、nLSU和mtSSU等多基因位点构建系统发育树，并结合孢子形态（利用扫描电镜和透射电镜）将其新组合至粉褶菌属[2]。该种在欧洲的记录极为零星，只在荷兰、意大利和西班牙等欧洲国家被报道，常发现其生于栎

收稿日期：2026-03-27
基金项目：山西省重点研发计划项目（202402140601016），山西省科技重大专项计划“揭榜挂帅”项目（202301140601015），山西省现代农业产业技术体系建设项目（2025CYJSTX09-05）
*通信作者：王术荣 wangsr2015@126.com，孟俊龙 mengjunlongseth@126.com

属（*Quercus*）或松属（*Pinus*）植物腐木上[3–5]。

红褐丝盖伞（*Inocybe rufobrunnea*）由瑞士真菌学家Favre于1955年首次发表，模式产地为瑞士，生于土壤并与仙女木属（*Dryas*）植物形成外生菌根伴生关系[6]。近年来，该种在欧洲产光滑孢子丝盖伞的多型性研究与新种发表工作中多次被列为关键比较对象。在分子系统发育上，该物种分类地位明确，且与近缘种纤细丝盖伞（*I. exilis*）之间的形态与分子界限已得到较为清晰的厘定[7]。目前，该物种在欧洲丹麦、瑞士、荷兰、奥地利、德国等多地均有报道，多生长于低海拔柳属（*Salix*）、桤木属（*Alnus*）及杨属（*Populus*）等多种阔叶树及松属（*Pinus*）林地下[8]。

斑点滴褶菇（*Staktophyllus guttulatus*）由意大利真菌学家Giacomo于1881年以*Panaeolus guttulatus*为名首次描述[9]，后经Giovanni在2023年基于ITS、nLSU多基因分子系统发育分析将其重新组合至滴褶菇属（*Staktophyllus*）[10]。该种在中亚（伊朗、巴基斯坦）和欧洲（意大利、希腊）等地均有报道，常生于松树枯枝落叶层上，亦见于较温暖环境（如沙丘后缘的草地沙质土）[11–12]。

山西省属温带大陆性季风气候区，植被以阔叶林为主[13]，菌类资源丰富。近年来，该地区新物种资源的发表主要集中在口蘑科[14–16]、牛肝菌科[17]、蜡伞科[18]、层腹菌科[19]、地星科[20]和枝瑚菌科[21]等，同时报道了梭孢杯伞属[22]、钬囊蘑属[23]、鬼伞属[24]和马鞍菌属[25]的一些中国新记录物种。这些新分类单元的发现，显著丰富了我国真菌资源的种类与地理分布信息。然而，相较于吕梁山和太行山地区丰富的菌类多样性，本底调查仍显不足，系统性研究有待加强。本研究对采自山西省吕梁山和太行山区3份疑似中国新记录标本开展物种鉴定研究和系统发育分析，旨在丰富山西省大型真菌物种多样性。

1　材料与方法

1.1　材料

供试标本采集于山西省境内太行山和吕梁山及其周边，经干燥后保存于山西农业大学菌物标本馆（Fungarium of Shanxi Agricultural University, FSAU）。

1.2　方法

1.2.1　形态学鉴定方法　在野外生态环境拍照记录的基础上，本研究采用经典分类学方法，对其宏观与微观特征进行观察。使用尼康显微成像系统（Nikon Eclipse Ni U）进行显微观察与图像采集，孢子测量遵循随机性原则，每次均统计显微镜视野内全部孢子。孢子尺寸数据来源于菌盖、菌褶或菌柄。孢子的测量数量不低于50个，其他结构不低于20个[26]。

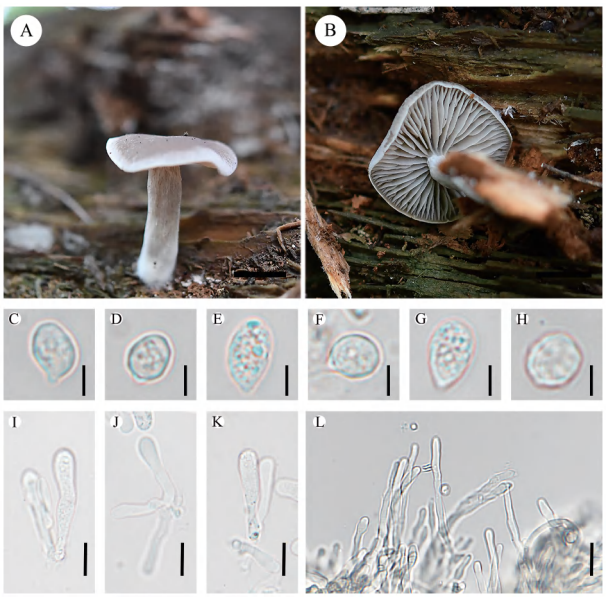
1.2.2　分子系统发育分析方法　采用E.Z.N.A.® Forensic DNA Kit试剂盒提取样品DNA，使用超微量紫外分光光度计测定DNA浓度。以提取的DNA为模板，分别使用引物ITS4/ITS5扩增ITS区[27]，LR0R/LR5扩增nLSU区[28]，MS1/MS2扩增mtSSU区[29]和RPB2-6F/RPB2-7CR扩增RPB2区[30]。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳验证后，使用E.Z.N.A.® Cycle-Pure Kit试剂盒纯化，送擎科生物科技有限公司进行双向测序。序列通过NCBI-BLAST进行比对分析。最大似然法（maximum likelihood, ML）系统发育树的构建采用MEGA10软件计算模型，自举值为2 000。采用贝叶斯分析法（bayesian inference, BI）构建MrBayes树，使用软件MrMTgui计算构建贝叶斯树的最佳模型，最后用软件Figtree v1.4对进化树进行后续处理。参与分析的序列包括自测序列和GenBank中下载序列。

2　结果

2.1　祖凯雷利氏粉褶菌 *Entoloma zuccherellii* Noordel.

菌盖直径1.5–2.5 cm，凸形，中间凹陷，边缘内卷，具弱透明条纹，有弱霜晶状微绒毛，中央深褐色，边缘红褐色。菌肉在菌盖中极少，气味不明显。菌褶直生至稍延生，间距稍宽，具两排小菌褶，厚且呈锯齿状，易碎，上部紫褐色，向边缘处逐渐变为与菌盖边缘同色，边缘不规则，颜色大致均匀。菌柄长2.5–3 cm，粗5–8 mm，圆柱状，下半部略扭曲，下半部红褐色，上半部与菌盖同色，幼时整个覆盖着白色易消失的菌丝，柄顶有霜晶状微绒毛（图1）。

孢子（5.5–）5.8–6.6（–7.0）×（4.7–）5.0–5.8（–5.9）μm，Q=（0.92–）1.00–1.32（–1.47），Qv=1.2，具有4–7个或多或少明显的角，或有时角更多但非常弱，变化为近瘤状，常为近球形而无明显角，



A–B：子实体；C–H：孢子；I–K：担子；L：褶缘囊状体。标尺：A–B=1 cm；C–H=5 μm；I–J=10 μm

A–B: Basidiomata. C–H: Spores. I–K: Basidia. L: Pleurocystidia. Bars: A–B=1 cm; C–H=5 μm; I–J=10 μm

图1 祖凯雷利氏粉褶菌的子实体和微观结构

Fig. 1 Basidiomata and microstructure of *Entoloma zuccherellii*

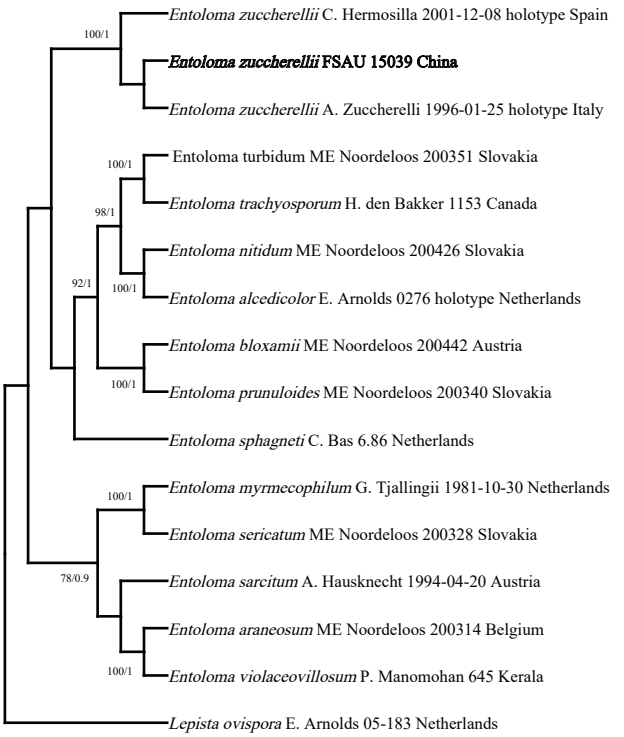
尖突明显，壁薄，常含一个大油滴。担子（25–35）×（10–15）μm，棒状至圆柱状，有时瓶状，具4个孢子，内含颗粒物，担子小梗长约4 μm。褶侧囊状体无。褶缘囊状体（40–45）×（15–25）μm（顶端宽8–12 μm），透明或内含颗粒物，有时壁厚。盖囊体未发现。盖皮由宽5–12 μm的圆柱状菌丝组成，其末端元素游离且未分化；皮下层由短至长的元素组成，为圆柱状至腊肠状或膨大状；两层中的色素均为壁生，在5% KOH溶液中观察时带有黄绿色斑点或颗粒。柄皮由平行、圆柱状、有隔的菌丝组成。锁状联合各处均无（图1）。

生境：夏秋季单生长于阔叶林腐木上。

分布：中国，西班牙，意大利。

研究标本：山西省晋中市和顺县白云村上野沟，2022年8月3日，王腾云，郭李峰，贾鸥阳，FSAU 15039。基因序列号：PZ273469（ITS），PZ256683（nLSU），PZ260761（RPB2），PZ267089（mtSSU）。

分子发育分析：经比对，本研究ITS序列与*Entoloma zuccherellii*参考序列的相似度为99.8%（604/605）。基于ITS区（605 bp）、nLSU区（867 bp）、mtSSU区（554 bp）和RPB2区（597 bp）4个DNA片段，总长度为2 623 bp。采用最大似然法和贝叶斯法构建的系统发育树表明，本文所描述的物种与*Entoloma zuccherellii*聚为一支，获得100%的最大似然支持率和1.0的贝叶斯后验概率支持（图2）。



内部节点的统计数值分别为ML/BI所得的数值，本研究所获取的序列用加粗字体表示，选用*Leepista ovispora*作为外类群，标尺表示进化距离

The statistical values of the internal nodes are the values obtained by ML/BI. The sequences obtained in this study are represented in bold font. *Leepista ovispora* is selected as the outgroup, and the scale bar represents the evolutionary distance

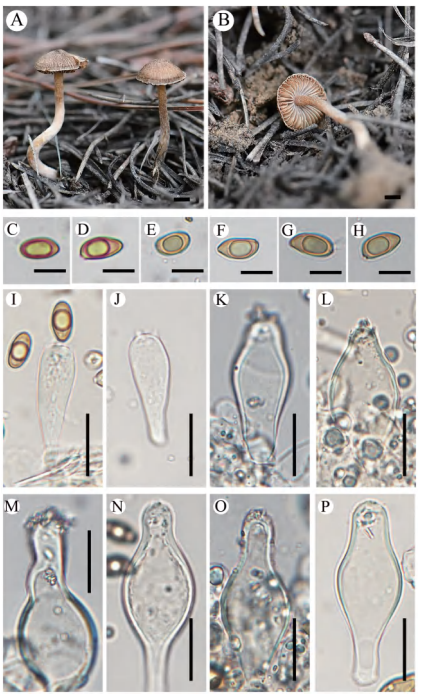
图2 基于ITS、nLSU、mtSSU和RPB2序列构建的祖凯雷利氏粉褶菌ML系统发育树

Fig. 2 *E. zuccherellii* ML phylogenetic tree based on ITS, nLSU, mtSSU和RPB2 sequences

2.2 红褐丝盖伞 *Inocybe rufobrunnea* J. Favre

菌盖直径2–5 cm，凸形，具相当粗糙的纤维，幼时被白色纤维状菌幕，深褐色。菌肉在菌盖处淡白色，菌柄处（特别是皮层）略带红褐色。菌褶窄

贴生，深红褐色，边缘疣状、白色。菌柄长5–10 cm，粗5–10 mm，等粗，实心，上部黄褐色至橙褐色，下部颜色稍深，基部深红褐色，顶端可见稍被粉状物，向下具纵向白色纤维（图3）。



A–B：子实体；C–H：孢子；I–J：担子；K–L：侧囊状体；M–N：褶缘囊状体；O–P：柄生囊状体。标尺：A–B=0.5 cm；C–H=5 μm；I–P=20 μm

A–B: Basidiomata. C–H: Spores. I–J: Basidia. K–L: Pleurocystidia. M–N: Cheilocistidia. O–P: Caulocistidia. Bars: A–B=0.5 cm, C–H=5 μm, I–P=20 μm

图3　红褐丝盖伞的子实体和微观结构

Fig. 3　Basidiomata and microstructure of *Inocybe rufobrunnea*

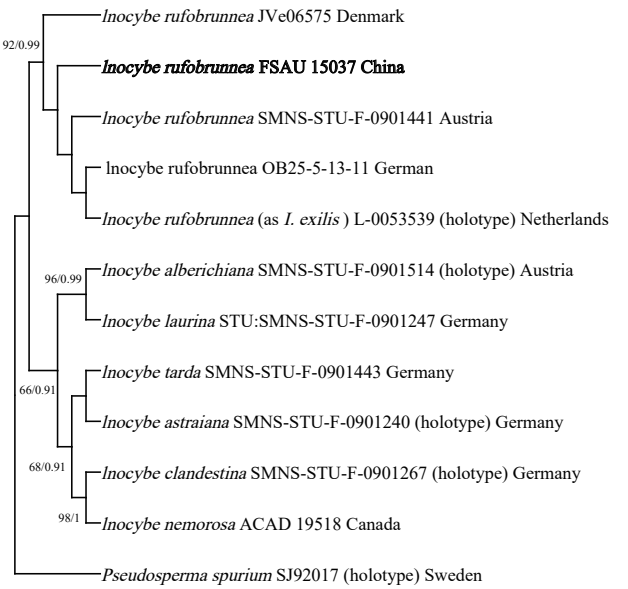
孢子（10.7–）11.0–14.8（–15.2）×（6.3–）6.6–8.5（–8.8）μm，Q =（1.22–）1.29–2.24（–2.41），Qv = 1.7，光滑，长椭圆形，顶端钝圆至乳突状。担子（25–37）×（7–12）μm，2–4孢子。褶侧囊状体（45–70）×（14–22）μm，多为（近）纺锤形或（近）瓶形，混有近棒状的囊状体，顶端通常含结晶，顶部壁厚达2.0 μm，遇3% KOH呈黄绿色。褶缘囊状体（34–65）×（15–18）μm，形态和大小跟侧囊体相似。柄囊体（30–55）×（13–16）μm，仅存在于菌柄顶部附近，近圆柱形或近纺锤形，大小与褶缘囊状体相似（图3）。

生境：夏秋季单生或群生于油松为主的针叶林地上。

分布：中国，丹麦，荷兰，奥地利，瑞士，德国。

研究标本：山西省朔州市怀仁县清凉山，2022年8月29日，王术荣，刘晋涛，FSAU 15037。基因序列号：PZ256682（ITS），PZ256677（nLSU）。

分子发育分析：经比对，本研究ITS序列与*Inocybe rufobrunnea*参考序列的相似度为99.2%（600/605）。基于总长1 555 bp的ITS区（605 bp）和部分nLSU区（950 bp）序列构建的系统发育树表明，本研究标本与*I. rufobrunnea*聚在同一分支，并获得强力支持（ML 92%/BI 0.99）。此前Bandini等[7]已指出*I. exilis*应为*I. rufobrunnea*的同物异名，本文的系统发育结果支持该结论（图4）。



内部节点的统计数值分别为ML/BI所得的数值，本研究所获取的序列用加粗字体表示，选用*Pseudosperma spurium*作为外类群，标尺表示进化距离

The statistical values of the internal nodes are the values obtained by ML/BI. The sequences obtained in this study are represented in bold font. *Pseudosperma spurium* is selected as the outer taxa, and the ruler represents the evolutionary distance

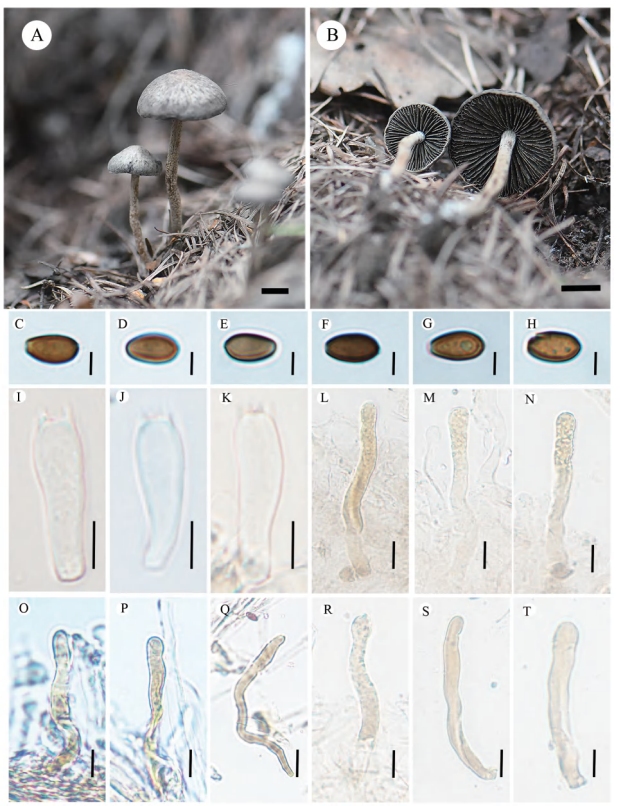
图4　基于ITS和nLSU序列构建的红褐丝盖伞ML系统发育树

Fig. 4　*I. rufobrunnea* ML phylogenetic tree based on ITS and nLSU sequences

2.3 斑点滴褶菇 *Staktophyllus guttulatus*（Bres.）Consiglio.

菌盖直径1.5–3 cm，初期凸起呈钟形，后期不规则展平，具低矮脐凸，偶见轻微凹陷，深褐色或黑棕色，边缘内卷，后逐渐平展，表面光滑，无光泽，覆盖细微白色粉状物。菌肉薄而脆，白色，无特殊气味，味道温和。菌褶较密，波状弯曲，微凹直生型，初期灰白色，迅速转为黑色，褶缘呈白色，具细绒毛结构，渗出微细白色水滴（随孢子成熟转为黑色）。菌柄长4–10 cm，粗2–8 mm，近圆柱形，灰白色，基部稍膨大，中空，顶端呈米棕色，基部常被白色菌丝覆盖（图5）。

孢子（7.1–）7.2–10.4（–10.5）×（3.5–）3.9–5.7（–5.8）μm，Q =（1.24–）1.26–2.67（–3.00），Qv = 1.8，近球形至椭圆形，深褐色，半透明至亚透明，壁厚1–1.5 μm，具明显尖突及油滴，萌发孔中央位，宽1–1.5 μm。担子（20–35）×（7–11）μm，棒状，常中部缢缩，多为四孢形。菌髓规则，由含黄褐色的圆柱形菌丝组成，宽7–15 μm。侧囊体不育。褶缘囊状体（30–45）×（12–17）μm，透明至黄橙色，顶部色浓，常被黄色黏液包裹。菌盖表皮为薄壁组织，厚40–100 μm。盖囊体（30–45）×（12–15）μm，类似褶缘囊状体，常覆盖黄色无定形黏稠物。柄囊体（45–55）×（10–20）μm，形态同褶缘囊状体，但更大，密集簇生并覆黏液。锁状联合存在（图5）。



A–B：子实体；C–H：孢子；I–K：担子；L–N：褶缘囊状体；O–Q：柄生囊状体；R–T：盖生囊状体；标尺：A–B=1 cm，C–H=5 μm，I–T=10 μm

A–B: Basidiomata. C–H: Spores. I–K: Basidia. L–N: Cheilocystidia. O–Q: Caulocystidia. R–T: Pileocystidia. Bars: A–B=1 cm, C–H=5 μm, I–T=10 μm

图5 斑点滴褶菇的子实体和微观结构

Fig. 5 Basidiomata and microstructure of *Staktophyllus guttulatus*

生境：夏秋季群生于落叶松林地上。

分布：中国，伊朗，巴基斯坦，意大利，希腊。

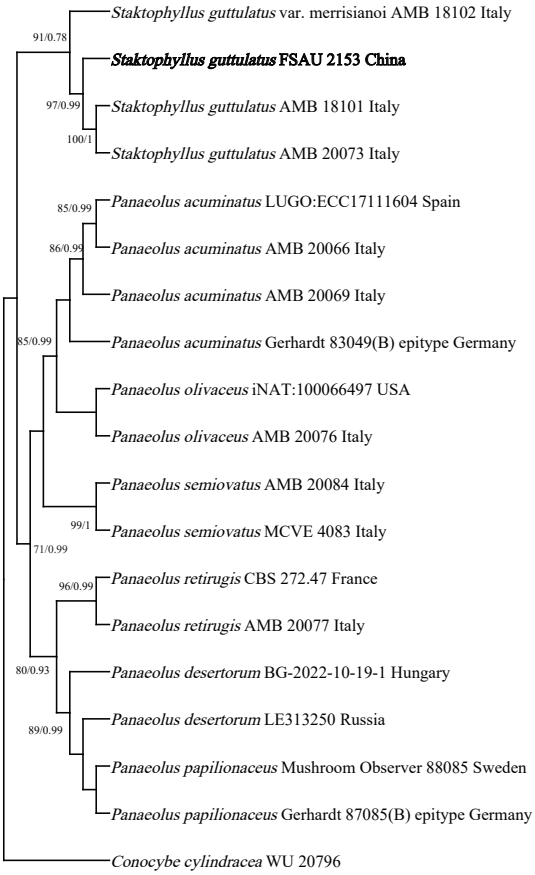
研究标本：山西省吕梁市交口县水头镇大南沟，2022年8月23日，王术荣，刘晋涛，FSAU 2153。基因序列号：PZ256681（ITS），PZ256676（nLSU）。

分子发育分析：经比对，本研究ITS序列与*Staktophyllus guttulatus*参考序列的相似度为99.7%（631/633）。基于总长1 542 bp的ITS区（633 bp）和部分nLSU区（909 bp）序列进行系统发育分析，采用最大似然法和贝叶斯法构建系统发育树。结果显示，本文所描述的物种与*Staktophyllus guttulatus*聚为一支，获得97%的最大似然自展支持率和0.99的贝叶斯后验概率。*S. guttulatus*所代表的进化枝构成的支系位于所有其他分支的基部（图6）。

3 讨论

祖凯雷利氏粉褶菌*E. zuccherellii*的典型形态特征包括棱角状孢子、红褐色菌盖以及柄顶有霜晶状微绒毛。在形态学研究上，本研究材料与欧洲标本基本一致，但孢子体积略小且菌盖边缘颜色稍浅，这些差异可能属于地理分布范围内的种内变异[2]。系统发育分析表明本研究材料的序列与*E. zuccherellii*模式标本聚在同一分支，并进一步支持了将*E. pluteisimilis*处理为*E. zuccherellii*异名的观点[3–5]。在生态方面，该物种生于阔叶林腐木上，生境类型与意大利记录基本一致，表明该种对生境具有相对稳定的生态偏好[7]。

红褐丝盖伞*I. rufobrunnea*的典型形态特征包括深褐色菌盖、红褐色菌褶及菌柄表面具纵向白色纤维。本次在山西发现的红褐丝盖伞与已报道在欧洲



内部节点的统计数值分别为ML/BI所得的数值，本研究所获取的序列用加粗字体表示，选用*Conocyybe cylindracea*作为外类群，标尺表示进化距离

The statistical values of the internal nodes are the values obtained by ML/BI. The sequences obtained in this study are represented in bold font. *Conocyybe cylindracea* is selected as the outer taxa, and the ruler represents the evolutionary distance

图6　基于ITS和nLSU序列构建的斑点滴褶菇ML系统发育树

Fig. 6　*S. guttulatus* ML phylogenetic tree based on ITS and nLSU sequences

发现的模式标本宏观描述极为相近，微观形态孢子大小近似。分子系统发育分析显示，本研究对应标本与欧洲的*I. rufobrunnea*聚为同一分支（ML 92%/BI 0.99）。与欧洲标本相比，本研究对应标本的菌盖颜色略深，菌柄基部深红褐色更为明显，且孢子尺寸略小[8]，这些差异可能属于地理分布范围内的种内变异。此外，本研究对应标本的褶侧囊状体顶端壁厚略薄，但形态（纺锤形至瓶形）高度一致。本次在山西采集的此物种发现生于以油松为主的针叶林地上，而欧洲标本生于阔叶树甸匐柳的钙质沙丘沙地[10]，与本研究对应标本生境有明显差异，表明其生境可能较为宽泛。本物种的生境、生态和分布尚需进一步深入探究和明确。

斑点滴褶菇*S. guttulatus*的典型特征包括菌褶边缘分泌特征性黄色胶滴、杏仁形大型孢子。在宏观形态上，本研究标本比意大利模式标本菌盖和菌褶颜色略浅，这可能与生长地域的环境差异有关。微观形态方面，两者在孢子、担子、缘囊体、侧囊体、褶缘囊状体以及菌盖皮层细胞的大小与形状基本无差异。分子系统发育分析表明该物种与斑褶菇属核心类群形成明确的平行分支，其作为独立属的地位得到了充分的分子证据支持。本次在山西发现该物种生长于落叶松林地上，与意大利模式标本生境高度一致[11]。该物种在北半球的欧洲等地曾有分布记录，属于典型的北温带分布种[12]。

本研究首次报道上述3种伞菌在中国的分布，各物种的已知地理分布范围扩大至东亚地区，进一步丰富了山西省伞菌目物种多样性记录。相关标本及序列数据可为粉褶菌属、丝盖伞属及斑点滴褶菇属物种的生物地理学及演化研究提供重要基础资料。

4　结论

首次报道了中国新记录种祖凯雷利氏粉褶菌（*E. zuccherellii*）、红褐丝盖伞（*I. rufobrunnea*）和斑点滴褶菇（*S. guttulatus*）。形态鉴定结果与基于ITS、nLSU、mtSSU和RPB2等序列的系统发育分析结果一致，3份标本的基因序列在系统发育树上与各自模式标本聚于同一分支。

参考文献

[1] Noordeloos M, Anton H. Tre nuove Entolomataceae (Agaricales) dall' Italia [J]. Bolletino Del Gruppo Micologico G. Bresadola, 2000, 43(3): 23-33.

[2] Co-David D, Langeveld D, Noordeloos ME. Molecular phylogeny and spore evolution of Entolomataceae [J]. Persoonia, 2009, 23(1): 147-176.

[3] Morozova O, Pham THG. New species of *Entoloma* subgenera cubospora and *Leptonia* (Agaricales, Basidiomycota) from central Vietnam [J]. JoF, 2023, 9(6): 621.

[4] Holec J, Noordeloos ME. On the infraspecific variability and taxonomic position of *Entoloma zuccherellii* [J]. Mycotaxon, 2010, 112(1): 283-289.

[5] Voto P. *Entoloma zuccherellii* from the Nordio wood (Italy) [J]. Mycological Observations, 2022, 6: 116-121.

[6] Favre J. Les champignons supérieurs de la zone alpine du Parc National Suisse [R]. Index of Fungi, 1955, 5(33): 105-201.

[7] Bandini D, Oertel B, Eberhardt U. More smooth-spored species of *Inocybe* (*Agaricales*, *Basidiomycota*): type studies and 12 new species from Europe [J]. Persoonia, 2022, 48(1): 91-149.

[8] Zhou YL, Deng LS, Yang SD, et al. Phylogenetic analysis, morphological studies, element profiling, and muscarine detection reveal a new toxic *Inosperma* (Inocybaceae, Agaricales) species from tropical China [J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1326253.

[9] Bresadola G. Fungi Tridentini novi, vel nondum delineati, descripti, et iconibus illustrati [M]. Vienna: C. Gerold's Sohn, 1883.

[10] Consiglio G, Marchetti M. Contributo alla conoscenza del Genere *Panaeolus* sensu lato [J]. Associazione Micologica Bresadola, 2023, 66(3): 209-286.

[11] Seidmohammadi E, Abbasi S, Asef M. The first report of *Panaeolus olivaceus* and *Panaeolus guttulatus* from Iran [J]. Taxon Biosyst, 2019, 11(1): 23-30.

[12] Senn-Irlet B, Nyffenegger A, Brenneisen R. *Panaeolus bisporus*—an adventitious fungus in central Europe, rich in psilocin [J]. Mycologist, 1999, 13(4): 176-179.

[13] 孙淑婧. 山西省林业生态旅游发展潜力与路径 [J]. 山西林业, 2024, (6): 20-21.
Sun SJ. Development potential and path of forestry eco-tourism in Shanxi Province [J]. For Shanxi, 2024, (6): 20-21.

[14] 刘虹, 郭尚, 范黎. 山西著名野生食用蘑菇红银盘: 漏斗伞属新物种 [J]. 山西大学学报: 自然科学版, 2019, 42(1): 275-280.
Liu H, Guo S, Fan L. *Infundibulicybe hongyinpansp*.nov., a well-known edible fungus from Shanxi based on both nrDNA-ITS and morphological analysis [J]. J Shanxi Univ Nat Sci Ed, 2019, 42(1): 275-280.

[15] 王术荣, 刘淑琴, 孟俊龙, 等. 山西太行山地区锈囊蘑属两新种 [J]. 菌物学报, 2022, 41(12): 1921-1931.
Wang SR, Liu SQ, Meng JL, et al. Two new species of *Melanoleuca* from Taihang mountains in Shanxi Province [J]. Mycosystema, 2022, 41(12): 1921-1931.

[16] Mao N, Yang JJ, Zhang YX, et al. Species diversity of *Tricholoma* (Agaricales, Tricholomataceae) from Shanxi Province of northern China with the description of four new species [J]. MycoKeys, 2025, 112: 59-80.

[17] Mao N, Zhao TY, Zhang YX, et al. Boletaceae from Shanxi Province of northern China with descriptions of ten new species [J]. Mycosphere, 2023, 14(1): 2013-2091.

[18] 张宇欣, 毛宁, 李颖, 等. 山西省蜡伞属真菌物种多样性及一新种的描述 [J]. 微生物学通报, 2024, 51(12): 5159-5176.
Zhang YX, Mao N, Li Y, et al. Species diversity of *Hygrophorus* (Hygrophoraceae, Agaricales) in Shanxi Province and description of *Hygrophorus brunneodiscoides* sp. nov [J]. Microbiol China, 2024, 51(12): 5159-5176.

[19] Li T, Mao N, Fu HY, et al. Two new species of *Hymenogaster* (Hymenogastraceae, Agaricales) from China based on morphological and molecular markers [J]. Diversity, 2024, 16(5): 303.

[20] Wu YQ, Liu SQ, Wang TY, et al. *Geastrum sanglinense*, a new species from the Manghe Rhesus Monkey National Nature Reserve, China [J]. Mycoscience, 2024, 65(1): 12-18.

[21] Li Y, Mao N, Zhang YX, et al. Catalogue of fungi in China 2. *Ramaria* from northern China [J]. Mycology, 2025, 16(1): 59-90.

[22] 刘淑琴, 王浩豪, 武艳群, 等. 下迪锈囊蘑(*Melanoleuca direnses*)—锈囊蘑属中国新记录种 [J]. 东北林业大学学报, 2022, 50(7): 77-80.
Liu SQ, Wang HH, Wu YQ, et al. *Melanoleuca direnses*: a newly recorded species of *Melanoleuca* Pat.in China [J]. J Northeast For Univ, 2022, 50(7): 77-80.

[23] 刘虹, 张泽乾, 毛宁. 基于形态特征和ITS片段分析确认山西发现极地梭孢杯伞 [J]. 中国食用菌, 2023, 42(1): 15-19.
Liu H, Zhang ZQ, Mao N. The finding of *Atractosporocybe polaris* in Shanxi Province based on both morphological and molecular evidences [J]. Edible Fungi China, 2023, 42(1): 15-19.

[24] 武艳群, 何轶榕, 刘淑琴, 等. 鬼伞属中国新记录种——椰枣色孢鬼伞 [J]. 东北林业大学学报, 2023, 51(8): 136-139.
Wu YQ, He YR, Liu SQ, et al. A new recorded species of *Coprinus* in China: *Coprinus spadiceisporus* [J]. J Northeast For Univ, 2023, 51(8): 136-139.

[25] 王腾云, 王静怡, 孟俊龙, 等. 马鞍菌属3个中国新记录 [J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3372-3381.
Wang TY, Wang JY, Meng JL, et al. Three new records of *Helvella* in China [J]. Microbiol China, 2023, 50(8): 3372-3381.

[26] 朱力扬, 图力古尔. 中国刺毛鬼伞属的物种多样性 [J]. 菌物学报, 2024, 43(3): 73-103.
Zhu LY, Tuliguer. Species diversity of *Tulosesus* (Psathyrellaceae, agaricales) in China [J]. Mycosystema, 2024, 43(3): 73-103.

[27] 赵杰. ITS序列分析及其在植物真菌病害分子检测中的应用 [J]. 陕西农业科学, 2004, 50(4): 35-37.
Zhao J. ITS sequence analysis and its application in molecular detection of plant fungal diseases [J]. Shaanxi J Agric Sci, 2004, 50 (4): 35-37.

[28] 农倩, 张雯龙, 蓝桃菊, 等. 一株抗香蕉枯萎病DSE菌株的筛选鉴定及抗病机理初探 [J]. 热带作物学报, 2017, 38(3): 559-564.
Nong Q, Zhang WL, Lan TJ, et al. Screening and identification of dark septate endophyte strain L-14 and its mechanism of banana *Fusarium* wilt disease resistance [J]. Chin J Trop Crops, 2017, 38 (3): 559-564.

[29] Liu YJ, Whelen S, Hall BD. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerse II subunit [J]. Mol Biol Evol, 1999, 16(12): 1799-1808.

[30] 黄宏强, 范小燕, 陶亚群, 等. 三七黑斑病病原菌的复核鉴定 [J]. 长江大学学报: 自科版, 2016, 13(15): 6-9, 3.
Huang HQ, Fan XY, Tao YQ, et al. Morphological and molecular identification of the *Alternaria* species causing black spot disease on *Panax notoginseng* [J]. J Yangtze Univ Nat Sci Ed, 2016, 13(15): 6-9, 3.

（责任编辑 朱琳峰）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):257-268

丛枝菌根真菌共生对黄芪幼苗促生机理研究

刘红军[1] 张胜[1] 杨卫平[1] 卢庚龙[1] 白雨果[1] 李婉迪[1] 牛景萍[1,2] 梁建萍[1,2*] 石志勇[1,2*]

（1.山西农业大学生命科学学院，太谷 030801；2.山西农业大学中兽医药现代化山西省重点实验室，太原 030006）

摘 要：【目的】探究摩西球囊霉（*Glomus mosseae*）接种对黄芪的促生作用及其内在机制。【方法】设未接种摩西球囊霉菌剂的CK组与接种摩西球囊霉菌剂的AMF组。栽培后，在黄芪快速生长期采集样本，测定摩西球囊霉对黄芪根的侵染率，以及株高、根长、主根直径、鲜干重等生长指标；利用RNA-Seq筛选不同处理的差异表达基因（DEGs），进一步分析不同处理对黄芪基因表达和分子机制的影响。【结果】接种摩西球囊霉促进了黄芪的生长发育。其中侧根数提升100%、株高提升42.01%、主根直径提升50%、地上部分鲜重提升37.84%、地下部分鲜重提升97.67%、地上部分干重提升75.36%、地下部分干重提升100%，根长因盆栽空间受限无显著差异。且摩西球囊霉对黄芪的侵染率达91.26%，形成稳定共生关系。转录组共筛选出584个DEGs，主要富集于苯丙烷生物合成、异黄酮生物合成及植物激素信号转导通路，bHLH、ERF等转录因子在通路中发挥核心调控作用。【结论】摩西球囊霉可通过植物激素信号调控关键次生代谢，优化黄芪根系发育，促进黄芪生长。

关键词： 丛枝菌根真菌；黄芪；互作关系；生长指标；促生效应；转录组

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1317

Mechanisms of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Symbiosis in Promoting Growth of Astragalus Seedlings

LIU Hong-jun[1] ZHANG sheng[1] YANG Wei-ping[1] LU Geng-long[1] BAI Yu-guo[1] LI Wan-di[1] NIU Jing-ping[1,2] LIANG Jian-ping[1,2*] SHI Zhi-yong[1,2*]

（1. *College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu* 030801; 2. *Shanxi Key Laboratory of Chinese Veterinary Medicine Modernization, Shanxi Agricultural University, Taiyuan* 030006）

Abstract: 【Objective】 To explore the growth-promoting effect and mechanism of *Glomus mosseae* inoculation on *A. mongholicus*. 【Method】 The experiment included two groups: a control group (CK) without *Glomus mosseae* and an AMF group inoculated with *G. mosseae*. After cultivation, samples were collected during the rapid growth period of *A. mongholicus*. The root colonization rate of *G. mosseae*, as well as growth parameters including plant height, root length, taproot diameter, and fresh and dry weights, were measured. RNA-Seq technology was used to analyze differentially expressed genes (DEGs) between treatments to further explore the effects on gene expression and molecular mechanisms in *A. mongholicus*. 【Result】 Inoculation with *Glomus mosseae* promoted the growth and development of *A. mongholicus*. Specifically, the number of lateral roots increased by 100%, plant height by 42.01%, taproot diameter by 50%, fresh weight of aboveground parts by 37.84%, fresh weight of belowground parts by 97.67%, dry weight of aboveground parts by 75.36%, and dry weight of belowground parts by 100%. No significant difference was observed in root length due to limited pot space. The root colonization rate of *G. mosseae* on *A. mongholicus* reached 91.26%, indicating the formation of a stable symbiotic relationship. A total of 584 DEGs were identified from the transcriptome data. Functional enrichment analysis showed that these DEGs were mainly enriched in the biosynthesis pathways of phenylpropanoids and isoflavonoids, as well as the plant hormone signal transduction pathway. Transcription factors such as bHLH and ERF played central regulatory roles in these pathways.

收稿日期：2025-12-04

基金项目：山西省科技重大专项计划“揭榜挂帅”项目（202401140601020），山西省科技成果转化引导专项（202304021301059），山西省现代农业中药材产业技术体系建设专项（2026-ZYC09），中兽医药现代化山西省重点实验室开放课题项目（SXKL2025006）

*通信作者：梁建萍 liangjp@sxau.edu.cn，石志勇 shizy@sxau.edu.cn

【Conclusion】*Glomus mosseae* can regulate key secondary metabolic processes through plant hormone signals, optimize root development, and thereby promote the growth of *A. mongholicus*.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi; *Astragalus membranaceus*; interaction; growth indicators; promoting effect; transcriptome

黄芪（*Astragalus membranaceus*）隶属于豆科黄芪属，是一种多年生草本植物，其核心品类主要包括蒙古黄芪与膜荚黄芪两类[1]。其中，蒙古黄芪是山西省极具代表性的道地药材，富含黄芪多糖、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮等多种活性化合物[2]。现代研究表明，这类成分赋予了黄芪诸多药用价值，例如能够清除体内氧化物质、对抗心肌缺血症状、辅助调节血压、发挥镇痛作用，同时还能有效增强机体自身的免疫功能[3-4]。

位于山西省浑源县的恒山山脉是蒙古黄芪的核心产区之一，该区域的黄芪生产主要采用野生和仿野生种植模式[5-6]。仿野生黄芪栽培周期长，长期的人种天养种植模式导致土壤可利用营养元素流失，黄芪产量和质量参差不齐，成为制约山西黄芪产业可持续发展的重要因素之一[7]。在此背景下，利用微生物菌剂改善根际微生态、强化养分循环，已被证实是药用植物生态栽培中极具潜力的调控策略[8-11]。其中，丛枝菌根真菌（arbuscular mycorrhizal fungi, AMF）因其独特的生态功能而备受关注。AMF是土壤微生物群落中的关键成员，可以与陆地生态系统80%以上的高等植物形成共生体系[12]。现有研究表明，不同AMF类群对宿主植物的亲和力存在显著差异，呈现出宿主偏好性特征[13]。其独特的宿主根内丛枝结构，和在地下形成的庞大菌丝网络，将植物与土壤环境紧密连接起来。丛枝菌根真菌与植物共生有利于植物生长，包括增加植物对水分和矿质元素的吸收[14-15]，提高植物对生物胁迫（害虫、细菌和真菌）和非生物胁迫（干旱、盐和重金属）的抗性[16-19]。同时丛枝菌根真菌招募土壤中的有益微生物，改善土壤微生物群落，调节土壤理化性质从而促进植物生长[15, 20]。尽管AMF的促生效应已在多种植物中得到验证，但对于AMF促进黄芪生长的植物体内机制变化尚未深入研究。

本研究以山西道地药材蒙古黄芪为对象，针对其仿野生种植中土壤肥力下降、产量与品质不稳的产业问题，探究摩西球囊霉（*G. mosseae*）对黄芪生长的促进效果，结合表型测定与转录组分析，研究摩西球囊霉对黄芪促生的分子机制，为蒙古黄芪仿野生栽培提供高效微生物菌剂和理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用黄芪种子均来自山西省浑源县，摩西球囊霉（*G. mosseae*）菌株筛选于山西省大同市浑源县野生或仿野生黄芪根际土壤。将摩西球囊霉（*G. mosseae*）菌株接种于生长1周的高粱和苜蓿根部，温室单孢培养3个月，之后将高粱和苜蓿根部粉碎，得到含有AMF的固体接种物粉末。将经过121 ℃高压灭菌处理沙土与含有AMF的粉末按3∶1（w∶w）比例充分搅拌混合均匀，随后播种消毒后的高粱和苜蓿种子，在温室、盆栽条件下扩大繁殖。3个月后检测侵染率，去掉地上部分，将根部与基质一起粉碎，获得AMF菌剂以供后续试验使用，阴凉处风干，4 ℃保存。

1.2 方法

1.2.1 盆栽实验 选取颗粒饱满状态一致的黄芪种子，经2%次氯酸钠消毒后，30 ℃水浴3 h，避光萌发1-2 d。土壤选择沙土、园土和蛭石等比例混合，经120 ℃、121 kPa灭菌处理2 h。选取萌发一致的黄芪种子种植于直径15 cm、高12 cm的花盆中。对照（CK）为未添加摩西球囊霉（*G. mosseae*）菌剂土壤，AMF处理为添加摩西球囊霉（*G. mosseae*）菌剂（质量比10%）。每个处理10盆。培养箱温度25 ℃、光照16 h/黑暗8 h。

1.2.2 菌根侵染率测定 菌根侵染率参照Bohrer等[21]方法测定。选取1 cm左右的新鲜根段，于10% KOH溶液高温消煮脱色20 min，2% HCl酸化5 min，0.05%台盼蓝乳酸甘油溶液（乳酸∶甘油∶水=1∶1∶1）高温染色30 min，最终置于乳酸甘油溶液（乳酸∶甘油∶水=1∶1∶1）脱色过夜，显微镜下用十字交叉法观察染色根段[22]，记录交叉点上菌丝、泡囊、丛枝等数据。菌根侵染率计算公式：菌根侵染率（%）=（根段总交叉点数-无侵染交叉

点数）/根段总交叉点数×100%。

1.2.3　黄芪生长指标的测定　盆栽生长90 d后，剔除长势不一致的植株，挑选30株黄芪进行株高、根长、主根直径、鲜重、干重以及侧根数测定。

1.2.4　黄芪根部RNA提取、文库构建和测序　对黄芪根部组织样本采用Trizol法提取总RNA，对提取产物的纯度及浓度利用NanoDrop 2000进行测定。采用1%琼脂糖凝胶电泳和Agilent 5300生物分析仪联合检测RNA完整性。将符合质量的RNA样品委托上海美吉生物技术有限公司完成转录组文库的构建工作，采用Illumina NovaSeq 6000测序平台测序。对下机数据使用FASTP（v0.19.5）进行质量评估和预处理，包括接头序列切除、低质量reads（质量值Q<20）剔除及含N比例过高（>5%）序列的过滤，最终得到高质量clean reads用于后续分析。

1.2.5　测序组装及差异基因表达分析　采用HISAT2（v2.1.0）将clean reads与黄芪参考基因组进行序列比对。通过TransRate（v1.0.3）和BUSCO（v3.0.2）两种方法对组装结果进行质量评估。基于RSEM（v1.3.3）软件进行基因表达水平的定量分析，以TPM（Transcripts Per Million）作为表达量的标准化指标。针对CK与AMF之间的差异表达基因采用DESeq2（v1.26.0）进行筛选，设置筛选条件为$|\log_2FC|\geq1$且校正后P值<0.05。利用GO数据库和KEGG数据库对筛选出的差异表达基因进行功能注释和富集分析。

1.2.6　转录组数据验证　以黄芪根样本提取的总RNA为模板，使用MonScriptTM RTIII Super All-in-One Mix with dsDNase（Monad Biotech）进行反转录反应，合成cDNA链。利用Primer Premier 5软件设计特异性定量PCR引物（附表1），选取*Am18S*基因作为内参基因进行表达量归一化。实时荧光定量PCR扩增体系总体积为20 μL，反应条件：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性10 s，60 ℃退火延伸30 s，40个循环。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法测定每个基因的相对表达量[23]。

2　结果

2.1　接种AMF后黄芪的生长和生理反应

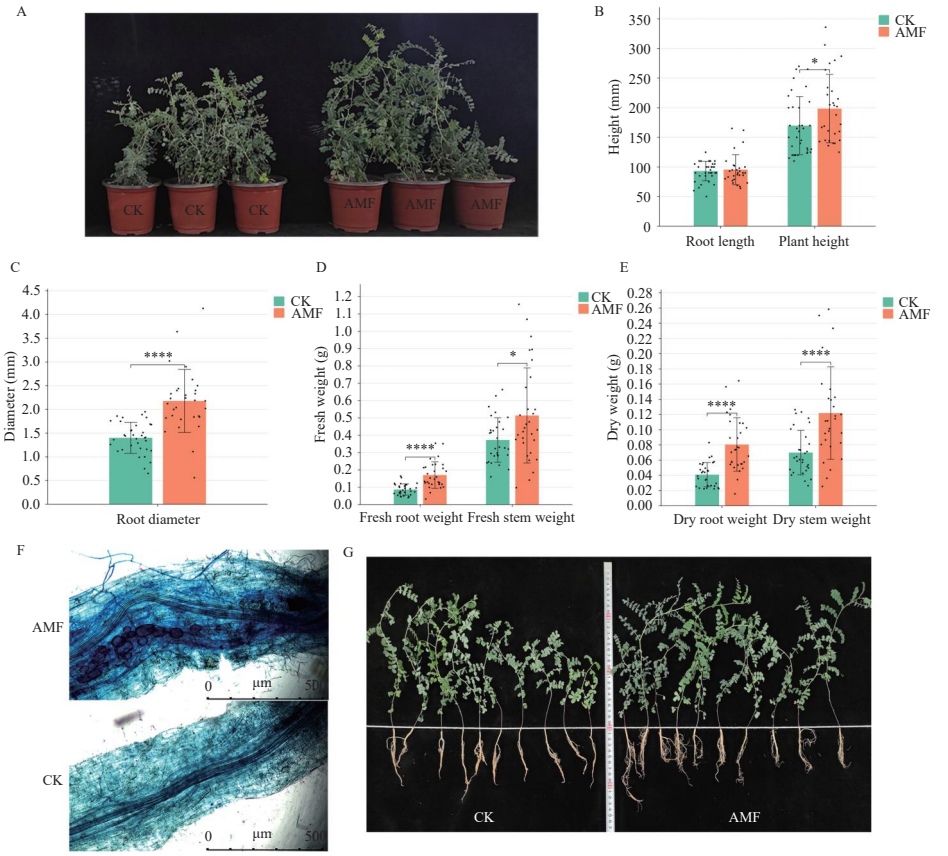
接种AMF 90 d后，接菌黄芪平均株高为19.8 cm，显著高于未接菌植株的16.9 cm（图1-A, B）。接菌与未接菌植株根系平均长度分别为9.5 cm和9.3 cm，差异较小，可能与盆栽条件下根系生长空间受限有关（图1-B）。接菌植株主根平均直径为2.1 mm，显著粗于未接菌植株（1.4 mm）（图1-C）。接菌植株地下、地上鲜重分别为0.17 g和0.53 g，显著高于未接菌植株的0.08 g和0.41 g（图1-D），且地下干重与地上干重的比值亦存在显著差异（图1-E）。同时，AMF与黄芪之间存在良好的共生关系（图1-F），侵染率达91.26%；CK组没有侵染情况出现。此外，接菌黄芪侧根数平均为10，未接菌侧根数为5，接种AMF 90 d后侧根数显著增加（图1-G）。结果表明，AMF接种能够有效促进黄芪幼苗期根、茎的生长以及侧根的发育。

2.2　接种AMF对黄芪基因表达的影响

采集6份接种AMF 90 d的黄芪和未接菌黄芪根样品进行转录组测序分析，得到40.77 Gb的有效测序数据（clean data）。经质量评估，每个样品的有效数据量均超过6.47 Gb，Q30质量值碱基占比均在96.56%以上（附表2）。共鉴定出40 227个表达基因。在这些基因中，已有注释信息的已知基因25 087个，通过组装新预测得到的未知基因15 140个。鉴定得到表达的转录本总数为61 829个，其中包含已知注释的转录本24 205个，以及新转录本37 624个。组内重复性较好，PCA分析显示接种和未接种之间存在较显著的转录差异性（图2-A）。基于表达量定量数据，采用DESeq2进行组间差异基因分析，设置筛选阈值为：差异倍数的绝对值$|\log_2FC|>=1$，同时P_{adjust}<0.05。获得两组间差异表达的基因，结果显示，有584个差异表达基因（DEGs），其中上调320个，下调267个（图2-B）。

2.3　AMF共生黄芪根差异表达基因功能注释分析

为深入解析黄芪根部584个差异表达基因（DEGs）的生物学功能特征，本研究对差异表达基因分别进行了GO功能注释和KEGG通路注释分析。GO功能注释分析结果显示（图3-A）：差异表达基因在生物学过程（biological process）类别中，主要富集于细胞过程（cellular process）和代谢过程（metabolic process）；在细胞组分（cellular component）类别中，细胞解剖实体（cellular anatomical entity）和含蛋白质复合物（protein-containing complex）为主要富集对象；而在分子功能（molecular function）类别中，则为结合功能（binding）和催化活性（catalytic activ-



A、G:植株生长90 d后菌根和非菌根植物表型。B–E:植株生长90 d后菌根和非菌根植物的根长、株高、主根直径、地下部分和地上部分鲜重和干重。F:接种和未接种90 d后植物根系染色。*P<0.05,****P<0.000 1

A, G: Phenotypic characteristics of mycorrhizal and non-mycorrhizal plants after 90 days of growth. B–E: Root length, plant height, taproot diameter, and fresh and dry weights of belowground and aboveground parts of mycorrhizal and non-mycorrhizal plants after 90 days of growth. F: Root staining of inoculated and non-inoculated plants after 90 days. *P<0.05. ****P<0.000 1

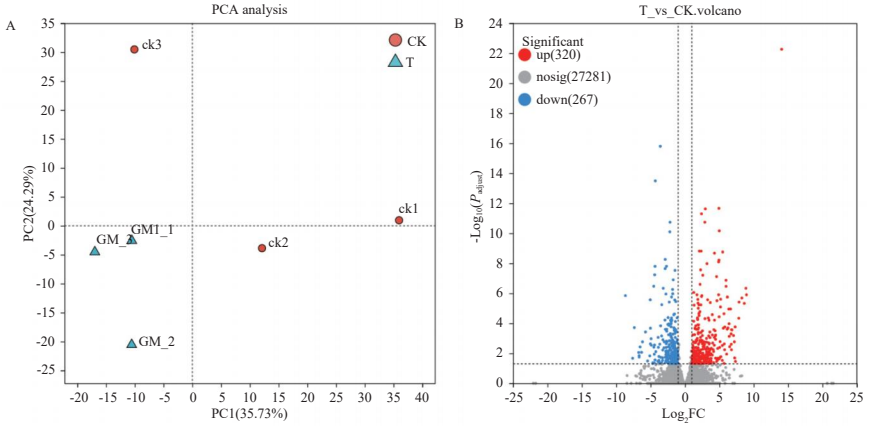
图1 AMF接种处理对黄芪生长发育的影响

Fig. 1 The influence of AMF inoculation treatment on growth and development of *Astragalus membranaceus*

ity)。KEGG功能注释分析结果表明（图3-B）：碳水化合物代谢（carbohydrate metabolism）基因数量超过25，是代谢（metabolism）类中基因最富集的通路。遗传信息处理（genetic information processing）类中折叠、分选与降解（folding, sorting and degradation）基因数量约15；复制与修复（replication and repair）基因数量约10。信号转导（signal transduction）是环境信息处理（environmental information processing）类中基因最富集的通路，说明差异基因大量参与细胞信号传递。运输与分解代谢（transport and catabolism）和细胞运动（cell motility）是细胞过程（cellular processes）类主要富集通路。

2.4 AMF共生黄芪根差异表达基因KEGG富集分析

对584个差异表达基因（DEGs）的KEGG功能富集分析结果显示（图4），苯丙烷生物合成（phenylpropanoid biosynthesis）、DNA复制（DNA replication）、异黄酮生物合成（isoflavonoid biosynthesis）、ATP依赖性染色质重塑（ATP-dependent chromatin remodeling）、植物激素信号转导（plant hormone signal transduction）、叶酸生物合成（folate biosynthesis）、丙酮酸代谢（pyruvate metabolism）、脂肪酸降解（fatty acid degradation）、角质素、软木脂和蜡质生物合成（cutin, suberine and wax biosynthesis）及ABC转运器（ABC transporters）。其中苯丙烷生物合成通路、异黄

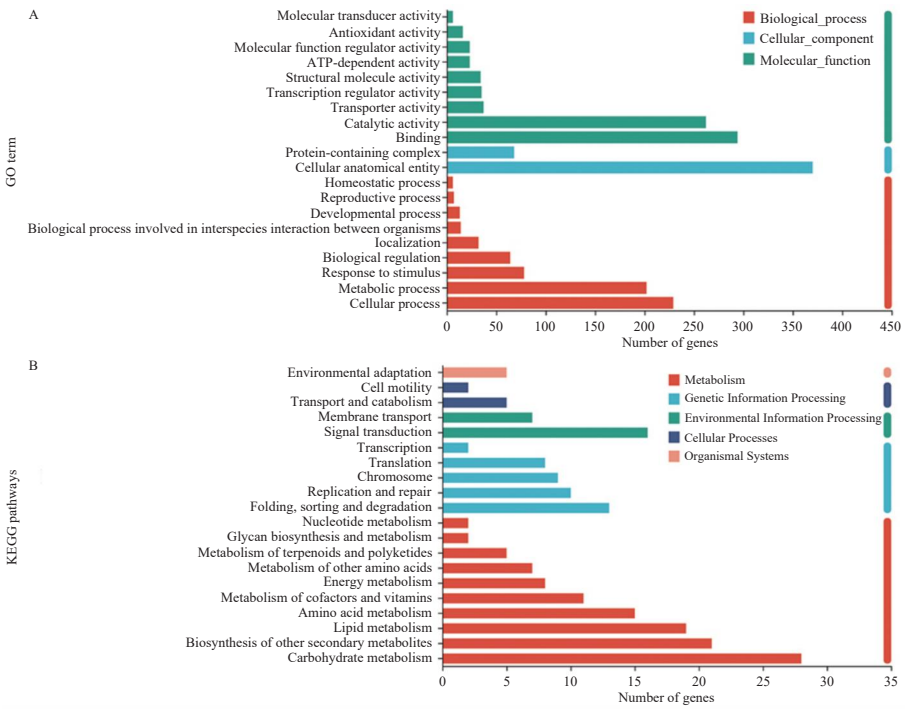


A：各样本间PCA分析；B：AMF与CK比较分析得出的差异基因，筛选阈值参照$|\log_2FC|>=1$ & $P_{adjust}<0.05$。上调基因320个，以红色标注；下调基因267个，以蓝色标注

A: PCA analysis among samples. B: Differentially expressed genes identified by comparative analysis between AMF and CK groups, with screening thresholds set as $|\log_2FC|\geq1$ & $P_{adjust}<0.05$. A total of 320 up-regulated genes are marked in red, and 267 down-regulated genes are marked in blue

图2　转录组数据PCA分析与差异基因火山图

Fig. 2　PCA analysis and volcano plot of differentially expressed genes of transcriptome data



A：GO功能注释；B：KEGG功能注释

A: GO functional annotation; B: KEGG functional annotation

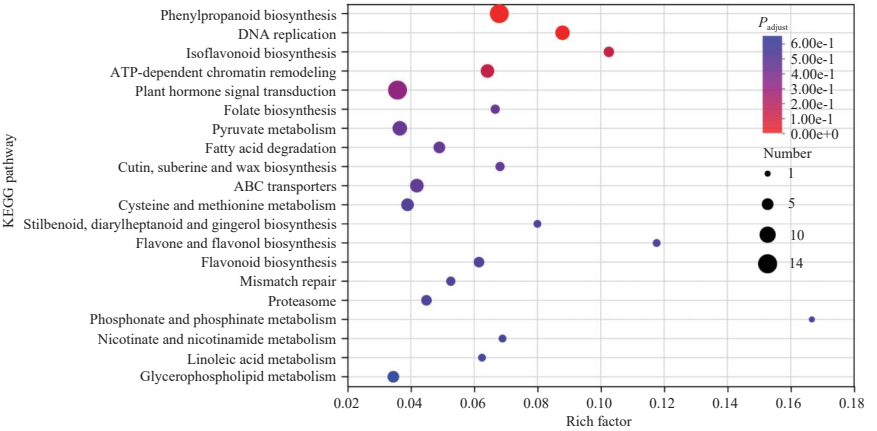
图3　差异表达基因功能注释

Fig. 3　Functional annotation of differentially expressed genes

酮生物合成通路与植物激素信号转导通路，均属于与植物生长发育及次生代谢过程密切相关的核心通路。

2.5　苯丙烷生物合成通路

苯丙烷生物合成通路是植物中一条重要的次生



横坐标指通路中富集的差异基因占总差异基因的比例,纵坐标指富集的KEGG通路

The *x*-axis indicates to the number of pathway-specific DEGs divided by the total number of DEGs, the *y*-axis represents the KEGG pathways

图4 差异基因KEGG通路富集分析

Fig. 4 KEGG pathway enrichment of DEGs

代谢途径，对植物生长有多方面的影响。KEGG富集分析结果表明，苯丙烷生物合成通路富集结果在统计学上极为显著，差异基因在苯丙烷生物合成通路中的聚集不是随机现象。本研究挑选并绘制出富集在苯丙烷生物合成通路中的DEGs观察其表达状况（图5）。苯丙氨酸→肉桂酸：由PAL（苯丙氨酸解氨酶）催化，这是苯丙烷代谢的限速步骤，将苯丙氨酸脱氨转化为肉桂酸；肉桂酸→肉桂酰-CoA：由CYP73A（肉桂酸-4-羟化酶的同源酶类）催化，使肉桂酸活化成肉桂酰-CoA，进入后续分支代谢；CAD6（肉桂醇脱氢酶6）将p-香豆酰-CoA还原为p-香豆醇，是H型木质素（对羟基苯木质素）的直接前体，可进一步参与黄酮、木质素的合成；同时CAD6还参与咖啡酰-CoA向咖啡醇的转化；最终生成G型木质素前体。PER家族酶（过氧化物酶类，如PER51/PER5等）参与羟基化、氧化反应；ALDH2（醛脱氢酶2）催化中间代谢物的氧化，最终生成S型木质素前体芥子醇（紫丁香基木质素）。

2.6 异黄酮生物合成通路

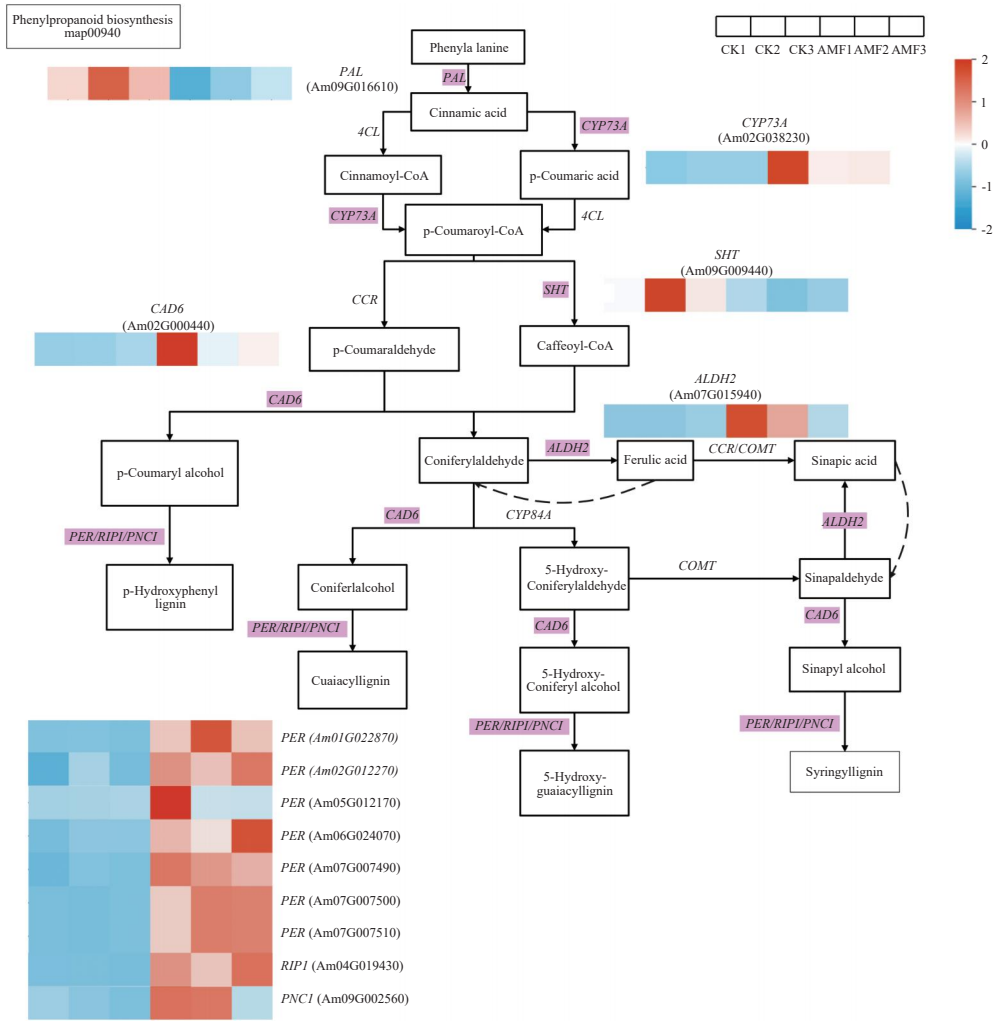
异黄酮生物合成通路是植物次生代谢的核心通路之一。KEGG结果表明4个DEGs在异黄酮生物合成中富集（图6）。*CYP81E1/E7*属于细胞色素P450酶家族，催化异黄酮的2′-羟基化反应，是异黄酮结构修饰的关键步骤；PTS（紫檀烷合成酶）催化环化反应，转化为Medicarpin的前体，最终生成Medicarpin。

2.7 植物激素信号转导通路

植物激素信号转导是植物通过一系列分子机制，感知激素信号并将其转化为细胞内反应，从而调控生长发育、应对环境胁迫等生命活动的过程。不同植物激素的信号转导通路精准调控植物的各个生长阶段。KEGG结果表明有14个DEGs在植物激素信号转导通路中富集（图7）。其中，生长素（auxin）信号转导通路，基因*IAA26-1*、*IAA26-2*、*IAA27*、*SAUR*下调，基因*GH3*上调；细胞分裂素（cytokinin）信号转导通路，基因*ARR-A*显著上调；脱落酸（abscisic acid）信号转导中，基因*SNRK2*显著下降；茉莉酸（jasmonic acid）信号转导通路，基因*COI-1*、*TIFY10B*显著下调；水杨酸（salicylic acid）信号转导通路，基因*PR1-1*、*PR1-2*、*At2g1*显著上调。

2.8 转录因子与差异基因的调控网络

基于苯丙烷生物合成、异黄酮生物合成和植物激素信号转导通路中的32个DEGs筛选出11个转录因子家族（图8-A），其中有多个基因对应同一转录因子，也有多个转录因子调控同一基因现象存在。苯丙烷生物合成通路中bHLH、MYB家族包含的DEG数量为4个；其次是ERF、NAC、WRKY家族，均包含2个；最后是TCP家族包含1个差异基因。异黄酮生物合成通路中bHLH家族中包含的DEGs数量为2个；ERF家族包含1个。植物激素信号转导通路中bHLH、ERF、FAR1家族中包含的DEGs数量为6个；其次是



PAL：苯丙氨酸解氨酶；*CYP73A*：肉桂酸-4-羟化酶；*4CL*：4-香豆酸辅酶A连接酶；*SHT*：5-羟色胺N-羟基肉桂酰基转移酶；*CCR*：肉桂酰辅酶A还原酶；*CAD6*：肉桂醇脱氢酶6；*PER/RIP1/PNC1*：过氧化物酶类；*ALDH2*：醛脱氢酶2。紫色标注的基因为差异表达基因并附带表达量热图

PAL: Phenylalanine ammonia-lyase; *CYP73A*: Cinnamate-4-hydroxylase; *4CL*: 4-coumarate: CoA ligase; *SHT*: Serotonin N-hydroxycinnamoyltransferase; *CCR*: Cinnamoyl-CoA reductase; *CAD6*: Cinnamyl alcohol dehydrogenase 6; *PER/RIP1/PNC1*: Peroxidases; *ALDH2*: Aldehyde dehydrogenase 2. Genes marked in purple are differentially expressed genes, accompanied by a gene expression heatmap

图5　苯丙烷生物合成通路

Fig. 5　Phenylpropanoid biosynthesis pathway

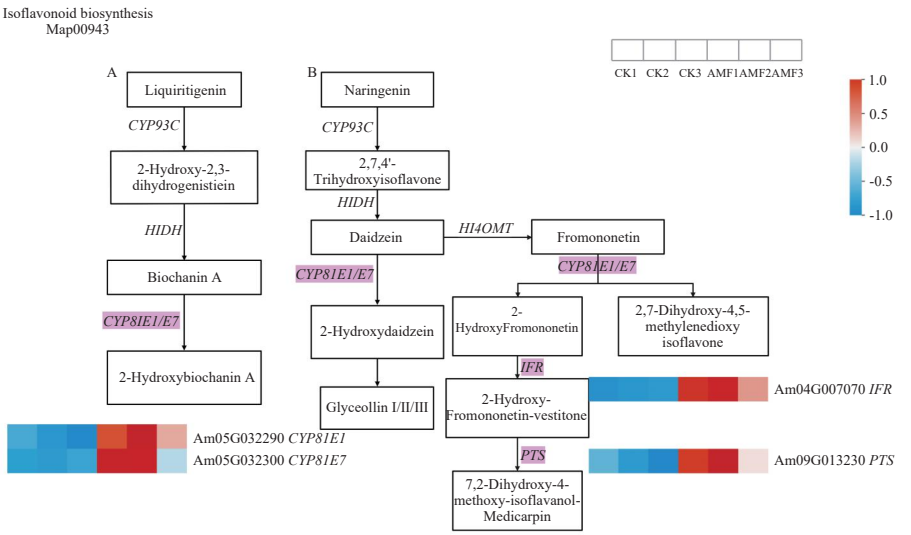
bZIP家族，包含4个DEGs；TCP、BBR-BPC、Dof家族均包含2个DEGs；NAC、MYB、CAMTA家族包含1个差异基因。综上，bHLH、ERF家族在3个通路中调控DEGs数量最多，推测其为核心转录因子（图8-B）。

2.9　基因表达验证

对丙烷生物合成、异黄酮生物合成和植物激素信号转导各通路中的部分基因利用RT-qPCR方法进行表达验证，7个基因的表达趋势与转录组数据分析结果一致（图9），证明测序数据及后续分析的可靠性。

3　讨论

接种摩西球囊霉（*G. mosseae*）90 d后，黄芪生长表型显著改善，同时摩西球囊霉与黄芪根系形成稳定共生关系，该结果与刘云龙等[24]研究结论一致，进一步证实AMF对豆科植物生长的普遍促进作用。尤其在根系结构优化方面，侧根数量成倍增长的现象与AMF在苹果根系上的作用结果相符[25]。



CYP93C:细胞色素P450酶家族;*CYP81E1/E7*:细胞色素P450酶;*IFR*:细胞色素P450单加氧酶;*PTS*:紫檀烷合成酶。紫色标注的基因为差异基因并附带表达量热图

CYP93C: Cytochrome P450 enzyme family; *CYP81E1/E7*: Cytochrome P450 enzyme; *IFR*: Cytochrome P450 monooxygenase; *PTS*: Pterocarpan synthase. Genes marked in purple are differentially expressed genes, accompanied by a gene expression heatmap

图6 异黄酮生物合成通路

Fig. 6 Isoflavonoid biosynthesis pathway

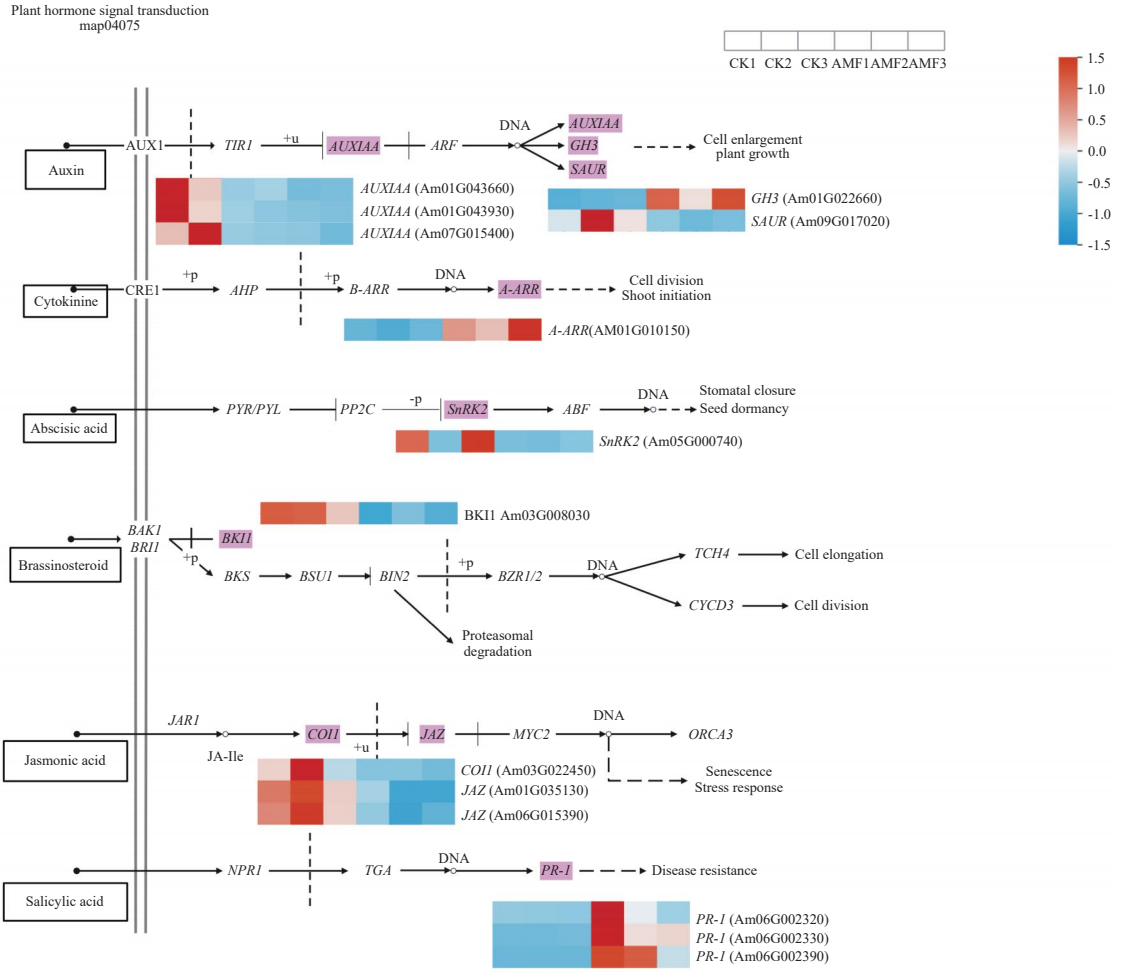
意味着黄芪根系与土壤的接触面积显著扩大，这在仿野生栽培的干旱、贫瘠土壤条件下，能有效提升水分与氮、磷等矿质元素的吸收效率，进而为地上部株高增长和地下根茎加粗提供关键物质保障[26]，为株高提升和地下根茎加粗奠定物质基础。

转录组测序分析共获得584个差异表达基因，上调基因与下调基因数目分别为320个和267个。经GO/KEGG注释与富集分析，确定苯丙烷生物合成、异黄酮生物合成、植物激素信号转导为三大核心通路，同时明确了关键转录因子家族的调控作用，为AMF和黄芪共生的分子机制提供了重要依据。

苯丙烷生物合成通路在植物中兼具生长与抗逆防御的双重作用[27]，与本研究中AMF对黄芪的表型调控效果高度契合。Boerjan等[28]研究表明该通路的中间产物可合成木质素，该通路的木质素合成关键基因*PER*、*CAD6*显著上调，可推动木质素积累，既增强黄芪茎秆机械支撑力、解释株高增加的表型，也能稳固根系结构、保障须根发育[29]。转录因子层面，bHLH与MYB家族各有4个差异表达基因，二者可协同激活*PER*、*CAD6*等基因表达，是AMF调控黄芪生长与抗逆平衡的核心因子。

异黄酮是一类主要存在于豆科植物中的酚类次生代谢产物，具有抗氧化、抗炎、调节植物防御反应等功能，同时对人类健康有重要价值[30]。本研究发现该通路有4个DEGs富集，且bHLH家族（2个DEGs）为主要调控因子。有研究发现异黄酮可诱导根瘤菌趋化性及*nod*基因表达[31]，本研究中异黄酮通路的*IFR*、*CYP81E1*等基因上调，可能通过增强黄芪与土壤微生物的互作，优化根际微环境，间接促进养分吸收；异黄酮可通过交叉作用影响植物激素信号[32]，本研究中异黄酮通路与植物激素信号转导通路的DEGs存在协同变化，*IFR*、*CYP81E1*的上调与细胞分裂素通路*ARR-A*基因的激活、生长素通路*IAA26*基因的下调形成呼应。构建了“异黄酮–激素”交叉网络，通过精准调控根、茎生长的资源分配，既促进须根萌发与根茎加粗，又保障地上部株高合理增长，契合黄芪以根为药用部位的栽培需求。

植物激素信号转导通路是调控植物生长发育的关键途径[33]，该通路有14个DEGs富集，且bHLH、ERF、FAR1家族（各6个DEGs）为核心调控因子。其中，细胞分裂素通路*ARR-A*基因显著上调，增强细胞对细胞分裂素的响应，推动细胞分裂与伸长，直接促进黄芪株高与根茎粗度提升[34]，这直接解



Auxin：生长素；*AUX/IAA*、*GH3*、*SAUR*：生长素早期响应基因。Cytokinin：细胞分裂素；*A-ARR*：细胞分裂素响应因子。Abscisic acid：脱落酸；*SnRK2*：蔗糖非发酵-1-相关蛋白激酶2。Brassinosteroid：油菜素甾醇；*BKI1*：油菜素内酯受体激酶BRI1的负调控因子。Jasmonic acid：茉莉酸；*COI1*：茉莉酸受体；*JAZ*：转录抑制因子；Salicylic acid：水杨酸；*PR-1*：病程相关蛋白1。紫色标注的基因为差异表达基因并附带表达量热图

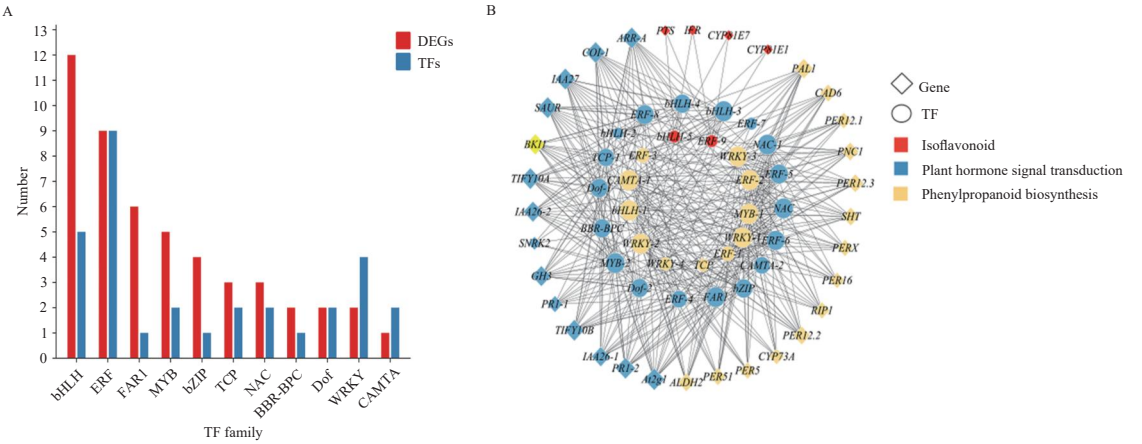
Auxin: Auxin; *AUX/IAA*, *GH3*, *SAUR*: Early auxin-responsive genes. Cytokinin: Cytokinin; *A-ARR*: Cytokinin response factor. Abscisic acid: Abscisic acid; *SnRK2*: Sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 2. Brassinosteroid: Brassinosteroid; *BKI1*: Negative regulator of brassinolide receptor kinase BRI1. Jasmonic acid: Jasmonic acid; *COI1*: Jasmonate receptor; *JAZ*: Transcriptional repressor. Salicylic acid: Salicylic acid; *PR-1*: Pathogenesis-related protein 1. Genes marked in purple are differentially expressed genes, accompanied by a gene expression heatmap

图7　植物激素信号转导通路

Fig. 7　Plant hormone signal transduction pathway

释了株高增加、根茎粗度提升的表型，是AMF促进黄芪地上部生长的关键信号；生长素通路：*IAA26-1*、*IAA26-2*、*SAUR*等基因下调，这可能与盆栽根系生长受限的环境有关——生长素下调可避免根系过度纵向伸长，转而促进须根萌发，与须根数翻倍表型一致，体现了AMF对黄芪根系生长的适应性调控；脱落酸与茉莉酸通路*SNRK2*、*COI-1*显著下调，而脱落酸与茉莉酸是典型的胁迫响应激素，其基因下调可能表明AMF通过缓解黄芪的胁迫感知，减少能量消耗于防御，转而将资源分配至生长[35]。水杨酸通路*PR1*上调，可增强植物免疫[36]。AMF通过调控植物激素信号转导通路的促生长基因上调、胁迫基因下调，实现了黄芪生长与抗逆的资源优化分配，而bHLH、ERF、FAR1家族则是这一调控过程的“核心开关”。

综上，摩西球囊霉（*G. mosseae*）接种黄芪后，

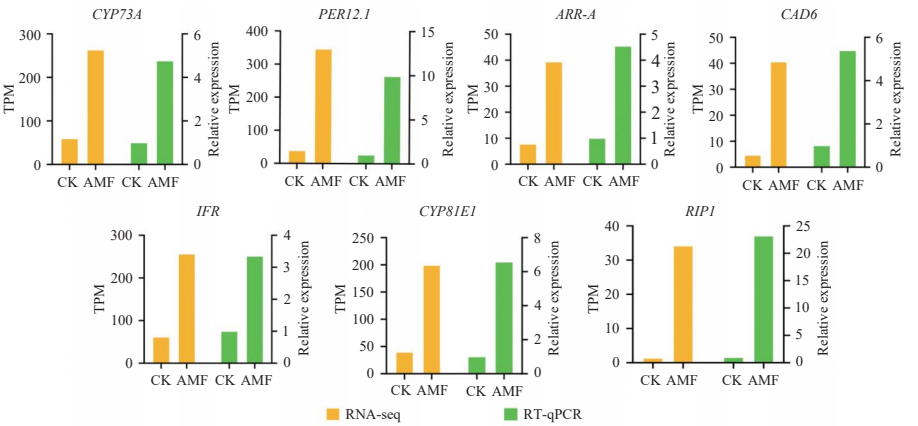


A:不同转录因子家族调控的差异基因数,以及转录因子家族中转录因子的数量。B:3个通路差异基因与转录因子的调控网络图

A: The number of DEGs regulated by different transcription factor families, and the size of each respective family. B: Regulatory network diagram of differentially expressed genes and transcription factors in the three pathways

图8 转录因子调控网络

Fig. 8 Transcription factor regulatory network



CK:未接种摩西球囊霉;AMF:接种摩西球囊霉

CK: Samples not inoculated with *G. mosseae*; AMF: Samples inoculated with *G. mosseae*

图9 差异表达基因的实时荧光定量PCR验证

Fig. 9 Validation of differentially expressed genes using RT-qPCR

通过调控bHLH、MYB、ERF等关键转录因子家族的差异表达，精准调控三大核心通路的功能，诱导苯丙烷生物合成通路中*PER*、*CAD6*基因上调，促进木质素积累，强化茎秆支撑与根系稳固，支撑株高增加的表型；激活异黄酮生物合成通路中*IFR*、*CYP81E1*基因，通过“异黄酮–激素”交叉网络优化根际微环境、调控根茎生长分配，契合黄芪药用部位发育需求；调控植物激素信号转导通路中14个DEGs的差异化表达，通过细胞分裂素促生长、生长素适应性调控、脱落酸与茉莉酸胁迫激素下调的协同作用，实现黄芪生长与抗逆的资源优化分配。最终，通过上述分子调控机制，显著促进黄芪幼苗期株高、根茎粗度提升及根系发育，为黄芪仿野生栽培中AMF的应用及分子调控提供了精准的理论支撑与实践依据。

4 结论

摩西球囊霉（*Glomus mosseae*）通过bHLH、MYB

和ERF等关键转录因子家族的精准调控，协同激活植物生长代谢相关通路（包括苯丙烷生物合成通路、异黄酮生物合成途径和植物激素信号转导通路），在强化黄芪根茎结构、优化根际微环境、平衡生长与抗逆资源分配3个层面发挥系统性调控作用，实现其对黄芪幼苗株高、根茎粗度及根系发育的显著促进作用。

文章所有附图附表请点击链接查看（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260506103916_NewsFile_7.pdf）

参考文献

[1] Dong PB, Wang LJ, Qiu DY, et al. Evaluation of the environmental factors influencing the quality of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* based on HPLC and the Maxent model [J]. BMC Plant Biol, 2024, 24: 697.

[2] 胡明勋, 陈安家, 郭宝林, 等. 影响山西恒山野生蒙古黄芪质量的环境因素研究 [J]. 中草药, 2012, 43(5): 984-989.
Hu MX, Chen AJ, Guo BL, et al. Effects of environmental factors on quality of wild *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* grown in Hengshan Mountain, Shanxi Province [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2012, 43(5): 984-989.

[3] 张雨晴, 王蕾. 黄芪双向调节血压的作用机制研究进展 [J]. 国际中医中药杂志, 2019, 41(8): 907-910.
Zhang YQ, Wang L. Review of mechanism on Astragalus membranaceus in two-ways regulation of blood pressure [J]. Inter J Tradit Chin Med, 2019, 41(8):907-910.

[4] Fu J, Wang ZH, Huang LF, et al. Review of the botanical characteristics, phytochemistry, and pharmacology of *Astragalus membranaceus* (Huangqi) [J]. Phytother Res, 2014, 28(9): 1275-1283.

[5] 周易, 李新星, 邹宇轩, 等. 不同种植模式黄芪药材质量与综合效益评价 [J]. 中国现代中药, 2025, 27(2): 296-303.
Zhou Y, Li XX, Zou YX, et al. Quality and comprehensive benefits of *Astragalus membranaceus* var. mongholicus cultivated in different patterns [J]. Mod Chin Med, 2025, 27(2): 296-303.

[6] 关佳莉, 丛悦, 徐媛媛, 等. 不同种植模式下黄芪根际环境与活性成分相关性研究 [J]. 中草药, 2025, 56(12): 4399-4409.
Guan JL, Cong Y, Xu YY, et al. Correlation between rhizosphere environment and contents of active components of Astragali *Radix* from different cropping modes [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(12): 4399-4409.

[7] 李志军, 孙德智, 贾俊英, 等. 不同栽培方式对蒙古黄芪药效品质及土壤微生态的影响 [J]. 时珍国医国药, 2024, 35(1): 197-200.
Li ZJ, Sun DZ, Jia JY, et al. Effects of different cultivation methods on pharmacological quality and soil microecology of *Astragalus mongholicus* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2024, 35(1): 197-200.

[8] 陈燕, 张鑫, 张丹, 等. 微生物菌肥对黄芪生长、活性物质积累及土壤养分吸收的影响 [J]. 中草药, 2025, 56(11): 4057-4068.
Chen Y, Zhang X, Zhang D, et al. Effects of microbial fertilizers on plant growth, bioactive metabolites accumulation, and soil nutrient absorption of *Astragalus mongholicus* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(11): 4057-4068.

[9] 杨振宇, 王宝慧, 宋诗娟, 等. 固氮菌剂对黄芪生长、土壤养分及酶活性的影响 [J]. 山西农业科学, 2022, 50(6): 861-868.
Yang ZY, Wang BH, Song SJ, et al. Effects of nitrogen-fixing bacteria on growth of *Astragalus membranaceus*, soil nutrient, and enzyme activity [J]. J Shanxi Agric Sci, 2022, 50(6): 861-868.

[10] Liang JP, Xue ZQ, Yang ZY, et al. Effects of microbial organic fertilizers on *Astragalus membranaceus* growth and rhizosphere microbial community [J]. Ann Microbiol, 2021, 71: 11.

[11] 樊良帅, 黄振斌, 晋小军, 等. 三种生物菌剂对黄芪根腐病防效及生长发育的影响 [J]. 农药学学报, 2025, 27(1): 160-170.
Fan LS, Huang ZB, Jin XJ, et al. Effects of three microbial agents on the control of *Astragalus membranaceus* var. mongholicus root rot and their influence growth and development [J]. Chin J Pestic Sci, 2025, 27(1): 160-170.

[12] Genre A, Lanfranco L, Perotto S, et al. Unique and common traits in mycorrhizal symbioses [J]. Nat Rev Microbiol, 2020, 18(11): 649-660.

[13] Kaur S, Campbell BJ, Suseela V. Root metabolome of plant-arbuscular mycorrhizal symbiosis mirrors the mutualistic or parasitic mycorrhizal phenotype [J]. New Phytol, 2022, 234(2): 672-687.

[14] Kakouridis A, Hagen JA, Kan MP, et al. Routes to roots: direct evidence of water transport by arbuscular mycorrhizal fungi to host plants [J]. New Phytol, 2022, 236(1): 210-221.

[15] Wang GW, Jin ZX, George TS, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance plant phosphorus uptake through stimulating hyphosphere soil microbiome functional profiles for phosphorus turnover [J]. New Phytol, 2023, 238(6): 2578-2593.

[16] Karthikeyan B, Abitha B, Henry AJ, et al. Interaction of rhizobacteria with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and their role in stress abetment in agriculture [M]//Pagano MC. Recent Advances on Mycorrhizal Fungi. Cham: Springer International Publishing, 2016: 117-142.

[17] Gao TT, Liu XM, Shan L, et al. Dopamine and arbuscular mycorrhizal fungi act synergistically to promote apple growth under salt stress [J]. Environ Exp Bot, 2020, 178: 104159.

[18] Huang D, Ma MN, Wang Q, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi enhanced drought resistance in apple by regulating genes in the MAPK pathway [J]. Plant Physiol Biochem, 2020, 149: 245-255.

[19] Adeyemi NO, Atayese MO, Sakariyawo OS, et al. Alleviation of heavy metal stress by arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Glycine*

max (L.) grown in copper, lead and zinc contaminated soils [J]. Rhizosphere, 2021, 18: 100325.

[20] Zhang CF, van der Heijden MGA, Dodds BK, et al. Correction: a tripartite bacterial-fungal-plant symbiosis in the mycorrhiza-shaped microbiome drives plant growth and mycorrhization [J]. Microbiome, 2024, 12: 30.

[21] Bohrer KE, Friese CF, Amon JP. Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in differing wetland habitats [J]. Mycorrhiza, 2004, 14(5): 329-337.

[22] Wang SY, Wei H, Chen KY, et al. Practical Methods for Arbuscular Mycorrhizal Fungal Spore Density, Hyphal Density and Colonization Rate of AMF[M]//Microbiome Protocols eBook. Bio-101: e2104253.

[23] Yang CQ, Fang X, Wu XM, et al. Transcriptional regulation of plant secondary metabolism [J]. J Integr Plant Biol, 2012, 54(10): 703-712.

[24] 刘云龙, 钱浩宇, 张鑫, 等. 丛枝菌根真菌对豆科作物生长和生物固氮及磷素吸收的影响 [J]. 应用生态学报, 2021, 32(5): 1761-1767.
Liu YL, Qian HY, Zhang X, et al. Impacts of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on growth, N bio-fixation, and phosphor-us uptake of legume crop [J]. Chin J Appl Ecol, 2021, 32(5): 1761-1767.

[25] Jing S, Li YC, Zhu LC, et al. Transcriptomics and metabolomics reveal effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and development of apple plants [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 1052464.

[26] Lynch J. Root architecture and plant productivity [J]. Plant Physiol, 1995, 109(1): 7-13.

[27] Dong NQ, Lin HX. Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant-environment interactions [J]. J Integr Plant Biol, 2021, 63(1): 180-209.

[28] Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis [J]. Annu Rev Plant Biol, 2003, 54: 519-546.

[29] Li MT, Cheng CX, Zhang XF, et al. Overexpression of pear (*Pyrus pyrifolia*) CAD2 in tomato affects lignin content [J]. Molecules, 2019, 24(14): 2595.

[30] Cao KF, Wang SJ, Zhang HM, et al. Transcriptomic regulatory mechanisms of isoflavone biosynthesis in *Trifolium pratense* [J]. Agronomy, 2025, 15(5): 1061.

[31] Sugiyama A, Yamazaki Y, Yamashita K, et al. Developmental and nutritional regulation of isoflavone secretion from soybean roots [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2016, 80(1): 89-94.

[32] Tian F, Jia TJ, Yu BJ. Physiological regulation of seed soaking with soybean isoflavones on drought tolerance of *Glycine max* and *Glycine soja* [J]. Plant Growth Regul, 2014, 74(3): 229-237.

[33] Waadt R, Seller CA, Hsu PK, et al. Plant hormone regulation of abiotic stress responses [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022, 23(10): 680-694.

[34] Kang NY, Kim MJ, Jeong S, et al. HIGH PLOIDY2-mediated SUMOylation of transcription factor ARR1 controls two-component signaling in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2024, 36(9): 3521-3542.

[35] Dar MH, Razvi SM, Singh N, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi for salinity stress: Anti-stress role and mechanisms [J]. Pedosphere, 2023, 33(1): 212-224.

[36] Ruiz-Lozano JM, Aroca R, Zamarreño ÁM, et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis induces strigolactone biosynthesis under drought and improves drought tolerance in lettuce and tomato [J]. Plant Cell Environ, 2016, 39(2): 441-452.

（责任编辑　张婷婷）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):269-281

加拿大一枝黄花病原菌鉴定及其复配制剂的生防效果

靳文涛[1#] 李迎新[2, 3, 4#] 杨绍红[1] 刘应高[1] 翟森[3] 蒋平[3] 宋雷[3] 李姝江[1*]
（1.四川农业大学林学院,成都 611130; 2.区域现代农业与环境保护省部共建协同创新中心,淮安 223300; 3.中铁二十三局集团有限公司,成都 610072; 4.南京大学人工智能与生物医药研究院,南京 210023）

摘 要:【目的】获取能有效防治加拿大一枝黄花（*Solidago canadensis* L.）的病原菌，将其与化学除草剂进行复配，并评估复配制剂的盆栽防治效果。【方法】对染病的加拿大一枝黄花植株叶片和根部进行组织分离，筛选对加拿大一枝黄花具有致病性的真菌，通过形态学与分子生物学方法对其进行鉴定。在此基础上，筛选与该菌相容性良好的化学除草剂，研制复配可湿性粉剂，开展盆栽防效试验。【结果】分离得到的致病菌鉴定为大豆间座壳菌（*Diaporthe sojae*）SC02菌株。复配可湿性粉剂的配方为：3%吐温80，1%木质素磺酸钠，0.9%黄腐酸，0.5 μL/mL 20%氯氟吡氧乙酸，7%高岭土，40% SC02菌株孢子（1×10^9 CFU/mL）。盆栽试验结果表明，在浓度为0.83-1.25 g/L时，该复配制剂对加拿大一枝黄花的株防效达70%-90%，鲜重防效达63%-73%，且未发现对周围其他植物产生不良影响。【结论】以SC02复配的可湿性粉剂质量符合国家要求，对加拿大一枝黄花株防效近90%，且复发率低，防除效果良好。

关键词： 加拿大一枝黄花；大豆间座壳菌；复配可湿性粉剂；生物防治
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1218

Pathogen Identification and Its Compound Formulations' Control Efficacy against *Solidago canadensis*

JIN Wen-tao[1#] LI Ying-xin[2, 3, 4#] YANG Shao-hong[1] LIU Ying-gao[1] ZHAI Sen[3] JIANG Ping[3] SONG Lei[3] LI Shu-jiang[1*]
（1. *College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Chengdu* 611130; 2. *Collaborative Innovation Center of Regional Modern Agriculture & Environmental Protection Co-constructed by the Province and Ministry, Huai'an* 223300; 3. *China Railway 23rd Bureau Group Co., Ltd., Chengdu* 610072; 4. *Nanjing University Institute of Artificial Intelligence Biomedicine, Nanjing* 210023）

Abstract:【Objective】This study aimed to isolate pathogenic fungi with high efficacy against Canadian goldenrod (*Solidago canadensis* L.), develop a combined formulation integrating the fungal agent with a chemical herbicide, and evaluate its control efficacy in pot experiments.【Method】Pathogenic fungi from diseased *S. canadensis* leaves and roots were isolated, screened, and identified via morphological and molecular methods. Furthermore, chemical herbicides compatible with the fungi were screened, and a compound wettable powder was developed. The control efficacy of this formulation was then tested in pot experiments.【Result】The isolated pathogen was identified as *Diaporthe sojae* strain SC02. The compound wettable powder formulation consisted of the following components: 3% Tween 80, 1% sodium lignosulfonate, 0.9% fulvic acid, 0.5 μL/mL 20% fluroxypyr, 7% kaolin, and 40% SC02 strain spores (1×10^9 CFU/mL). Pot experiment results showed that at concentrations ranging from 0.83 to 1.25 g/L, the compound formulation achieved a plant control efficacy of 70%-90% and a fresh weight control efficacy of 63%-73% against *S. canadensis*, with no adverse effects observed on surrounding plants.【Conclusion】The wettable powder formulated with SC02 meets national quality standards, exhibits nearly 90% control efficacy against *S. canadensis* plants, and has a low recurrence rate, demonstrating satisfactory weed control performance.

Keywords: *Solidago canadensis*; *Diaporthe sojae*; combined wettable powder; biological control

收稿日期：2025-11-11
基金项目：校企合作项目（LQS-KYHT-2023-002）
*通信作者：李姝江 14087@sicau.edu.cn
#同等贡献

加拿大一枝黄花（*Solidago canadensis* L.）为菊科（Asteraceae）一枝黄花属（*Solidago*）多年生草本植物，又称黄花草、黄莺、百根草或霸王花，叶披针形或线状披针形。加拿大一枝黄花在入侵地常形成单一优势种群落，不仅影响生态系统各功能群之间的相互作用，还会破坏生态系统的结构与功能，严重威胁本地生物多样性，甚至可能导致特定本地物种的局部灭绝[1]。由于其强烈的入侵性和生态危害，该物种已被广泛认定为恶性外来杂草，并先后被列入《中国外来入侵物种名单》及《重点管理外来入侵物种名录》[2]。

目前，化学防治仍是控制外来入侵杂草的有效手段，但其长期大规模使用易导致土壤和大气污染，破坏生态平衡。与化学农药相比，生物防治具有较低的生态风险和较好的安全性以及不易引发抗药性等优势，尤其适用于自然生态系统或荒耕野地中入侵生物的大规模治理。然而，生物防治也存在生效周期长、易受环境条件制约等局限。生物农药与化学农药各具优缺点，将二者科学结合，充分发挥各自优势，可为推进可持续农业的发展提供重要支撑[3-4]。已有研究表明：草甘膦与新型原卟啉原氧化酶抑制剂X18002复配使用，可使草甘膦用量减少750.0 g/hm^2，该复配处理在速效性方面优于单用草甘膦，在持效性方面优于单用X18002，对小飞蓬、狗尾草等入侵植物显示出显著的协同防治效果[5]。此外，将尖孢镰刀菌与草甘膦复配使用，可显著增强镰刀菌对空心莲子草防御酶的影响，从而有效抑制其生长[6]。另一研究发现，黏质沙雷氏菌Ha1与多种化学除草剂复配后，能够提升病原菌的活性，增强对马唐、稗草等杂草的抑制效果，进而提高整体防治效能[7]。因此，除草剂复配不仅能扩大杀草谱，还可降低用药量和使用成本，实现对抗性杂草的高效防控。然而，目前针对加拿大一枝黄花的微生物复配防治研究尚不多见，且加拿大一枝黄花拥有强大的根系繁殖能力，其发达的根系中每条根状茎都会进行分支，分支顶端均有芽，可在第2年再次萌发生长为完整植株，除之不尽，对加拿大一枝黄花的长效防控措施仍较为薄弱。在此背景下，开发能够有效预防或治理加拿大一枝黄花的生物防治方法，具有重要的现实意义。

本研究以加拿大一枝黄花为研究对象，通过对发病植株进行病原菌分离与鉴定，筛选出对该入侵植物具有致病性的真菌菌株。在此基础上，进一步筛选与上述真菌相容性良好的化学除草剂，并研制微生物-除草剂复合制剂。通过盆栽试验评估其防控效果，以期为加拿大一枝黄花的治理及防治提供理论依据和技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 自四川省龙泉驿区加拿大一枝黄花入侵地采集长势基本一致、生长良好、根部保留完好的加拿大一枝黄花200株，高度为70-80 cm；健康的非寄主植物容器苗各20株：一年生香樟（*Cinnamomum camphora* L.），均高70 cm，一年生楠木（*Phoebe zhennan* S. K. Lee & F. N. Wei），均高50 cm，由中铁二十三局龙泉驿区苗圃园提供，种植于四川农业大学成都校区第五教学楼大棚内，温度25-28 ℃，相对湿度70%-80%，16 h光照/8 h黑暗。

1.1.2 试验试剂 20%氯氟吡氧乙酸（浓度1 μL/mL），25%环嗪酮（浓度0.02 g/mL），41%草甘膦异丙胺盐（浓度0.02 g/mL），48%三氯吡氧乙酸丁氧基乙酯（浓度10 μL/mL）购自江苏中旗作物保护股份有限公司；10%精草铵膦胺盐（浓度10 μL/mL），20%唑草酮（浓度1 μL/mL），20%二甲四氯水剂（浓度5 μg/mL）购自江苏明德立达作物科技有限公司；高岭土，硅藻土，膨润土购自成都市科龙化工试剂厂；硅胶购自青岛海浪硅胶干燥剂有限公司；黄腐酸购自西陇化工股份有限公司；糊精，木质素磺酸钠，木质素磺酸钙，PEG2000购自成都市科龙化工试剂厂；吐温80，吐温20购自成都市科隆化学品有限公司；海藻酸钠购自成都市科隆化学品有限公司；真菌基因组DNA提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 病原菌分离、筛选与鉴定

（1）病原菌的分离。2023年10月从四川省成都市龙泉驿区加拿大一枝黄花入侵区域内采摘患病植株，利用组织分离法分离病原菌[8]。纯化后，将菌株再次接种到PDA培养基上备用。

（2）病原菌寄主专一性与致病性测定。在防治过程中，需确保病原菌对加拿大一枝黄花具有高度

专一性。因此，在进行专一性测定时，优先选用该入侵种分布区内有代表性的非靶标植物作为试验对象[9]。将分离获得的菌株于PDA培养基中培养5 d后，取菌落边缘直径7 mm的菌丝块，分别接种于健康盆栽的加拿大一枝黄花、楠木和香樟植株上。每种植株各选择5株，其中4株作为重复，1株作为对照，以此进行专一性致病测定。其中叶部接种采用针刺法[10-11]，接种时在健康嫩叶上使用医用针头轻轻戳刺叶片，刺出的圆形孔洞组合形成的大小形状需与菌饼相似，同时将菌丝块倒置放在健康嫩叶上，用湿纱布包裹后在外层用保鲜膜包裹保湿，每种菌至少3次重复，并设置对照，以观察病原菌对寄主植物的侵染能力及对非寄主植物的潜在影响[12]，同时依据科赫法则观测叶片发病症状并对发病叶片再次进行病原菌分离鉴定，对病原菌进行验证。由于非寄主植物多为木本，而加拿大一枝黄花为草本，为降低接种误差，根部接种采用离体根部接种法[13]，接种后的观察项目与叶部接种一致。病害严重度按0-5级标准进行评估[14]。

（3）病原菌的鉴定。形态学鉴定：将筛选所得致病效果最佳的病原菌菌株分别接种于PDA培养基中心，于25 ℃恒温培养5 d。肉眼观察菌落的培养特性与宏观形态，包括菌落颜色、表面褶皱、质地、边缘特征、菌丝密度及气味等。待病原菌产孢后，采用正置显微镜观察其微观形态结构，包括菌丝形态、粗细、孢子大小与形状等。最后，综合培养性状和显微形态特征，参照真菌鉴定手册[15]对该病原菌进行比对鉴定。

分子生物学鉴定：采用DNA提取试剂盒将提取得到的供试菌株的DNA作为模板，采用真菌通用引物*ITS*1/*ITS*4、特异性引物延伸因子-1（*EF*-1α）、钙调素基因（*CAL*）和组蛋白3基因（*HIS*）片段分别对供试菌株基因组DNA进行扩增[16-17]（表1）。PCR总反应体系为25 μL，分别为模板DNA：1 μL，上游引物：1 μL，下游引物：1 μL，ddH_2O：9.5 μL，Super Mix：12.5 μL；PCR反应程序：预变性94 ℃，5 min；（变性94 ℃，30 s；退火55 ℃，1 min；延伸72 ℃，30 s）重复30个循环，终延伸72 ℃，5 min；4 ℃保存。

将测序结果在NCBI GenBank数据库分析比较，根据比对结果确定建树用序列集，通过多基因联合建树分析，运用MEGA11做同源性分析并用邻接法构建系统发育树，确定目标真菌的系统进化地位。

表1　实时荧光定量PCR引物

Table 1　Primers for RT-qPCR

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	序列 Sequence（5′-3′）
ITS	ITS1	TCCCTAGCTGAACCTCCCC
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATCC
CAL	CAL-F	GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC
	CAL-R	CATCTTCTGGCCATCATGG
EF-1α	B.d-F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG
	B.d-R	TACTTGAAGGAACCCTTACC
HIS	H3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG
	H3R	GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT

1.2.2　加拿大一枝黄花复配除草剂筛选

（1）单剂测定。采用盆栽试验法。试验共设置8个处理组，包括7种化学除草剂处理及1组清水对照，每个处理重复10株。待加拿大一枝黄花株高40-50 cm时进行叶面喷雾处理，每株施用100 mL药液，均匀喷湿茎叶至液滴开始下滴为止。施药后15 d观察并记录植株受害症状与死亡率。

（2）相容性测定。将7种化学除草剂与病原菌分别进行相容性试验[18]。

①孢子悬浮液的配制。将病原菌于PDA培养基上培养至产生大量孢子，刮取孢子，加入10 mL无菌水，用振荡器充分振荡混合均匀后，通过血球板计数法测定孢子浓度[19]。

孢子数量=（N/5）×25×10×10^3×稀释倍数×孢子悬浮液体积

②除草剂对菌株生长影响。采用含药平板法。将7种化学除草剂分别加入PDA培养基中，以购买除草剂时的推荐浓度制备成含药平板，每种处理做4次重复。接入病原菌后于28 ℃黑暗条件下培养10 d。采用十字交叉法测量菌落直径用于初筛。筛选出病原菌可以存活的化学除草剂，再以推荐浓度为中心设置浓度梯度进行复筛，依据菌落直径指标再次进行筛选。

③产孢量的测定。将步骤②中复筛的除草剂梯度浓度制成含药平板，并接种病原菌，每种处理做4

次重复，培养至产孢后刮取孢子，加入10 mL无菌水，用磁力振荡器充分振荡混合均匀后制成孢子悬浮液，通过血球板计数法测定孢子浓度。每个处理设置3次重复[20]。

④孢子萌发率的测定。将步骤②中复筛的除草剂梯度浓度与孢子悬浮液以1∶1比例混合，（25±1）℃下振荡培养48 h，以不加化学药剂的孢子悬浮液为对照，每个处理设置3次重复。计算孢子萌发率[14]。

综合步骤②③④，以菌落直径、产孢量、孢子萌发率3项指标，最终筛选出与病原菌生长相容性最佳的除草剂。

孢子萌发率（%）=萌发孢子数/调查孢子总数×100%

校正孢子萌发率（%）=（对照组萌发率−处理组萌发率）/（100−对照组萌发率）×100%

1.2.3 复配可湿性粉剂的研制与质量检测

（1）载体筛选。分别将高岭土、硅藻土、膨润土、硅胶[21-22]等载体分别按5%的浓度加入到固体培养基PDA中并接种病原菌，以菌落平均直径、产孢量为筛选指标。

（2）助剂筛选。紫外保护剂：分别将海藻酸钠、糊精和黄腐酸按0.5%的浓度添加至PDA固体培养基中[23-24]，设两个对照组：CK1（紫外照射、无保护剂）和CK2（无紫外、无保护剂），并全部接种病原菌。处理组培养2 d后，置于38 W、365 nm紫外灯下照射6 h，随后转移至28 ℃恒温培养箱中培养，待对照组菌落长满整个平板时，测量各处理菌落直径并统计产孢量。

分散剂：分别将木质素磺酸钠、木质素磺酸钙和亚甲基双甲基萘磺酸钠按3%的浓度加入PDA培养基[25-27]，接种病原菌后于28 ℃恒温培养，待对照组菌落长满时，记录菌落直径与产孢量。

润湿剂：润湿性能参照GB/T 5451-2001标准，以润湿时间≤1 min为合格。分别测试吐温20、吐温80和PEG2000在1%、3%和5%浓度下的润湿效果[28]。将上述润湿剂按3%添加量加入PDA培养基并接种病原菌，于28 ℃恒温培养至对照组菌落长满，测定菌落直径和产孢量。

（3）助剂配比优化。在单因素试验的基础上，选定润湿剂（1%−5%）、分散剂（1%−5%）和紫外保护剂（0.5%−0.9%）3个因素[25, 29]作为自变量（表2），并加入前期筛选得到的最佳浓度除草剂，以菌落直径和产孢量为评价指标，设计正交试验，以确定制剂的最佳配比及实现最大产孢量时各助剂的最适浓度。

表2 三种助剂最佳配比筛选

Table 2 Screening of the optimal ratio of three adjuvants

序号 Serial number	实验因素 Experimental factor		
	润湿剂 Wetting agent（%）	分散剂 Dispersant（%）	紫外保护剂 UV protectant（%）
1	1	1	0.5
2	5	3	0.5
3	3	5	0.5
4	5	1	0.7
5	3	3	0.7
6	1	5	0.9
7	3	1	0.9
8	1	3	0.9
9	5	5	0.9

（4）可湿性粉剂的加工。将孢子悬浮液与优化后的载体、助剂及除草剂按配比混合，充分搅拌至溶解，形成均匀混合液。随后于30 ℃条件下烘干（温度超过35 ℃易导致病原菌失活），直至样品重量变化趋于稳定。最后采用高速万能粉碎机进行粉碎处理，制备成可湿性粉剂。

（5）可湿性粉剂质量指标的检测。润湿时间检测参考GB/T 5451-2001[30]；悬浮率检测参考GB/T 14825-1993[31-32]；含孢量检测参考单孢萌发法；pH值检测参考GB/T 1601-1993[33]；细度参考GB/T 16150-1995[34]；起泡性参考GB/T 28137-2011[35]；干燥减量参考GB/T 30361-2013[36]；贮存稳定性参考NY/T 2293.1-2012。

1.2.4 盆栽防效试验 称取1 g所制粉剂，稀释浓度为20、10、5、2.5、1.25、0.83、0.63、0.5 g/L，共设8个处理组；以化学除草剂氯氟吡氧乙酸处理作为阳性对照（CK1），无菌水处理作为空白对照（CK2）。选取生长健康的加拿大一枝黄花100株，每个处理组重复10株，每株均匀喷施100 mL相应药液至茎叶完全湿润。于施药后20 d计算株防效与鲜重防效[37]。

株防效（%）=［1−（对照组药前杂草株数×处理

组药后杂草株数）/（对照组杂草株数×处理组杂草株数）］×100%

鲜重防效（%）=［（空白对照组杂草鲜质量–处理组杂草鲜质量）/空白对照组杂草鲜质量］×100%

1.2.5　数据处理与分析　抑菌率以及孢子数量等数据的处理采用Microsoft Excel 2020进行；对病原菌与7种化学除草剂的相容性、助剂筛选和配比、盆栽防效试验结果分别进行显著性分析，使用单因素ANOVA检验方法，采用SPSS 26.0进行；表格绘制采用Microsoft Excel 2020。

2　结果

2.1　病原菌分离结果

2.1.1　病原菌分离纯化　共分离纯化得到菌株100株，通过形态学鉴定将其分为7种菌株，分别编号为1–7（表3），其中SC02分离率最高，叶部为43%，根部为69%。将7株菌株试管保存，留待寄主专一性与致病性测定。

2.1.2　病原菌寄主专一性与致病性测定　由表4可知，仅SC02能够在有效防控加拿大一枝黄花的同时，对其周围非寄主植物不产生明显影响。如图1所示，菌株SC02、SC06和SC07均可在加拿大一枝黄花叶片上引起明显病斑，但SC06在另两种非寄主植物叶片上也表现出致病性，因此排除；SC07虽仅侵染加拿大一枝黄花，但所致病斑较小，致病能力有限；而SC02对加拿大一枝黄花叶片致病力较强，且对其他非寄主植物基本无致病作用。由图1与表4根部病级结果进一步得出，在3种候选病原菌中，仅SC02能够对加拿大一枝黄花根部造成显著影响。

表3　病原菌的分离结果

Table 3　Isolation results of pathogenic fungi

编号 No.	叶片分离株数 Number of leaf isolates	叶片分离率 Leaf separation rate (%)	根部分离株数 Number of root isolates	根部分离率 Root separation rate (%)
SC01	7	7	0	0
SC02	43	43	69	69
SC03	4	4	0	0
SC04	5	5	12	12
SC05	10	10	0	0
SC06	17	17	0	0
SC07	14	14	19	19

表4　筛选菌对加拿大一枝黄花及其非寄主植株的致病性

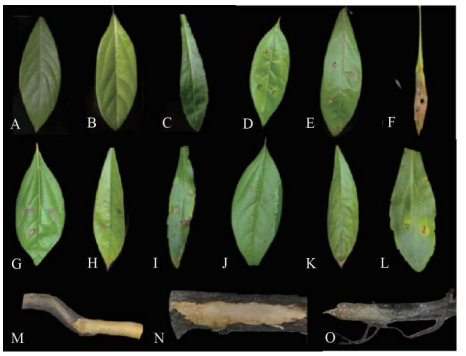
Table 4　Pathogenicity of screened strains against *S. canadensis* and its non-host plants

编号	叶部病级 Leaf disease grade			根部病级 Root disease grade		
No.	加拿大一枝黄花 *S. canadensis*	香樟 *C. camphora*	楠木 *P. zhennan*	加拿大一枝黄花 *S. canadensis*	香樟 *C. camphora*	楠木 *P. zhennan*
SC01	1	2	1	0	0	0
SC02	5	1	0	5	0	0
SC03	1	0	1	0	0	0
SC04	2	2	2	0	0	1
SC05	2	3	3	0	0	0
SC06	1	4	5	0	0	0
SC07	4	5	4	1	0	0

综上，最终选定SC02作为目标菌株。为确证其病原性，自发病叶片与根部的病健交界处重新分离并纯化病原菌，经鉴定与SC02菌株特性一致，符合科赫氏法则。

2.2　病原菌鉴定

（1）形态学鉴定。SC02培养6 d后，菌落正面为白色（图2-A），背面有少量姜黄色色素沉积，菌丝浓密，气生菌丝较发达（图2-B）；第12天开始产孢，菌丝减少，至16–20 d，菌株产孢达到最大（图2-C）。有性型特征（图2-D）显示，子囊壳呈黑色，球状或近球状，聚生，埋生于基质内，具有伸出于基质外的乳突状突起，突起（喙）长728.2–2 278.3 μm；子囊壳直径为261.5–303.2 μm。子囊单囊壁，无柄、棍棒状，内含8个子囊孢子，顶端有明显的顶环，子囊大小（图2-E）为(60.18–72.97)×(12.25–16.61)μm。子囊孢子透明，重叠单列，椭圆形或梭形，大小为(9.02–12.66)×(3.23–4.54)μm。观察到无性型分生孢子，α分生孢子大小为(5.4–7.0)×

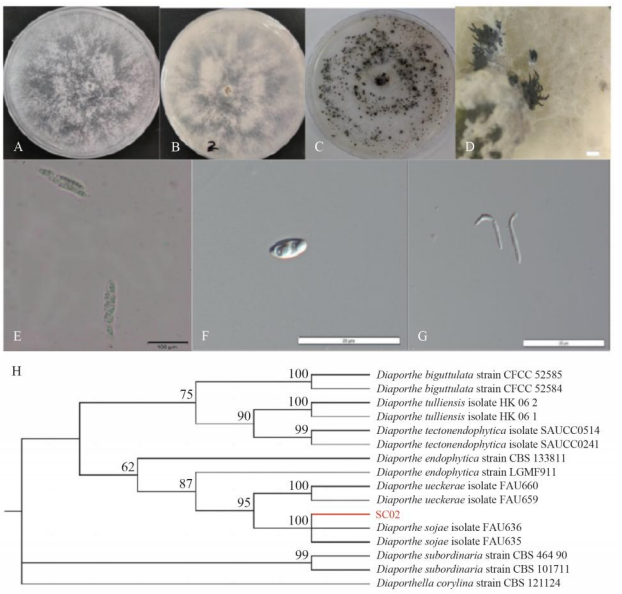


A–C：叶片无菌琼脂块对照（香樟、楠木、加拿大一枝黄花，下同）；D–F：叶片接种SC02；G–I：叶片接种SC06；J–L：叶片接种SC07；M–O：根部接种SC02

A–C: Leaf sterile agar block control (*C. camphora*, *P. zhennan*, *S. canadensis*, the same below); D–F: leaf inoculation with SC02; G–I: leaf inoculation with SC06; J–L: leaf inoculation with SC07; M–O: root inoculation with SC02

图1 叶片与根部接种图

Fig. 1 Leaf and root inoculation diagram



A：菌落图正面；B：菌落图背面；C：产孢培养基；D：子囊壳；E：子囊；F：α分生孢子；G：β分生孢子；H：菌株的系统发育进化树

A: Front view of the colony; B: back view of the colony; C: sporulation medium; D: ascus shell; E: ascus; F: α-conidia; G: β-conidia; H: phylogenetic tree of strains

图2 SC02菌株鉴定结果

Fig. 2 Identification results of SC02 strain

(2.0–3.1)μm，单胞，纺锤形至椭圆形，一端钝一端尖，无色，无分隔，含2个或多个油球（图2-F）。β分生孢子大小为(17.7–23.5)×(1.3–1.8)μm，单胞，钩状或弯曲状，基部为截形，无色，无分隔（图2-G）。依据上述形态学特征，初步将该病原菌鉴定为间座壳属（*Diaporthe*）。

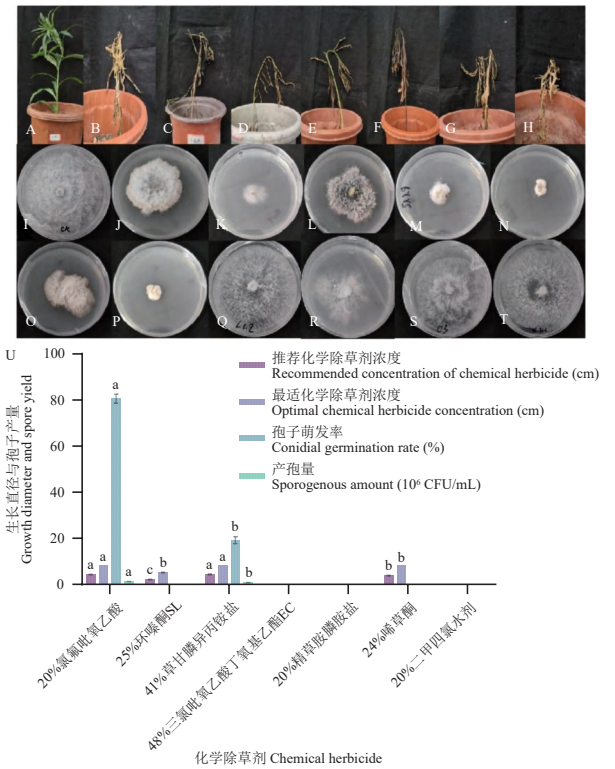
（2）分子生物学鉴定。提取SC02的DNA，对其ITS、TEF1、CAL、H3共计4个基因序列进行PCR扩增并测序。将SC02菌株的各DNA序列提交GenBank数据库获得登录号（ITS：PQ836619；TEF1：PQ863323；CAL：PQ868940；H3：PQ863324）并在NCBI中进行BLAST比对，在GenBank中下载用于鉴定的其他相关菌株的序列，使用4个基因序列联合构建系统发育树。如图2-H所示，该病原菌与大豆间座壳菌（*D. sojae*）聚为一类，遗传同源性最为显著，支持率达到100%。因此，依据形态学和分子鉴定，将分离所得的病原菌SC02鉴定为大豆间座壳菌（*Diaporthe sojae*）。

2.3 加拿大一枝黄花复配除草剂筛选

在单剂试验中，7种化学除草剂均能致加拿大一枝黄花死亡（图3-A–H），由表5可知20%氯氟吡氧乙酸，20%二甲四氯水剂两种除草剂对加拿大一枝黄花效果最好，在致死率100%的同时致死时间最短，4 d即可令加拿大一枝黄花完全死亡。

同时，将7种化学除草剂按照表5中推荐浓度加入PDA培养基制备平板，接种SC02菌株，培养7 d后发现，该菌在含20%氯氟吡氧乙酸、25%环嗪酮SL、41%草甘膦异丙铵盐及24%烯草酮的处理平板上均能生长（图3-I–P）。

对上述4种化学除草剂筛选最适生长浓度，结果如图3-Q–T所示，菌株SC02在含0.01 g/mL的25%环嗪酮SL平板中生长最差，相同培养时间内菌丝甚至无法长满整个平板（图3-R）；而在41%草甘膦异丙铵盐与24%烯草酮处理中，虽存在菌株可生长的浓度范围，但其除草活性已显著降低，最适生长浓度仅分别为5 μg/mL与0.1 μL/mL，无法有效防治加拿大一枝黄花。20%氯氟吡氧乙酸在推荐浓度1 μL/mL处理下菌落生长直径达4.2 cm，最适浓度0.5 μL/mL处理下菌落生长直径达8 cm，孢子萌发率在80%以上，产孢量维持在1.22×10^6 CFU/mL，均显著高于其他处理（$P<0.001$）。综上，20%氯氟吡氧乙酸在最适浓度0.5 μL/mL下与病原菌表现出非常优良的相容性（图3-Q，U）。因此，最终确定以0.5 μL/mL的20%氯氟吡氧乙酸作为后续复配制剂中的化学除草



A–H：单剂实验，分别为CK、20%氯氟吡氧乙酸、25%环嗪酮、41%草甘膦异丙铵盐、48%三氯吡氧乙酸丁氧基乙酯、10%精草胺膦胺盐、20%烯草酮、20%二甲四氯水剂组；I–P：化学除草剂推荐浓度筛选平板实验，分别为CK、20%氯氟吡氧乙酸、25%环嗪酮SL、41%草甘膦异丙铵盐、48%三氯吡氧乙酸丁氧基乙酯EC、10%精草胺膦胺盐、24%烯草酮、20%二甲四氯水剂组；Q–T：化学除草剂最适浓度筛选平板实验，20%氯氟吡氧乙酸、25%环嗪酮SL、41%草甘膦异丙铵盐、24%烯草酮组；U：加拿大一枝黄花复配除草剂筛选柱状图，图中推荐浓度为购买农药时官方推荐稀释浓度，最适浓度为推荐浓度稀释后病原菌最优生长浓度，不同小写字母表示同一时间不同处理间的差异显著性（P<0.001），下同

A–H: Single-dose test. CK, 20% clopyralid, 25% carfentrazone, 41% glyphosate isopropylamine salt, 48% triclopyr butoxyethyl ester, 10% quizalofop-p-ethyl, 20% flumioxazin, 20% dimethachlor aqueous solution group, respectively. I–P: Screening plate for recommended concentrations of chemical herbicides. CK, 20% clopyralid, 25% carfentrazone SL, 41% glyphosate isopropylamine salt, 48% triclopyr butoxyethyl ester EC, 10% quizalofop-p-ethyl, 24% flumioxazin, 20% dimethachlor aqueous solution group, respectively. Q–T: Screening plate for optimal concentrations of chemical herbicides. 20% clopyralid, 25% carfentrazone SL, 41% glyphosate isopropylamine salt, 24% flumioxazin group, respectively. U: Bar chart of screening results for compound herbicides against *S. canadensis*. The recommended concentration refers to the dilution concentration officially recommended for the purchased herbicide. The optimal concentration indicates the dilution of the recommended concentration that supports the optimal growth of the pathogen. Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments at the same time (P<0.001), the same below

图3　复配除草剂筛选结果

Fig. 3　Screening results of compound herbicides

剂组分。

2.4　可湿性粉剂的研制与质量检测

2.4.1　载体和润湿剂、紫外保护剂、分散剂的筛选结果　根据4种载体的筛选结果（图4-V），与对照组相比，硅胶、高岭土和膨润土均表现出较好的生物相容性（图4-A–G）。其中，硅胶处理效果最佳，病原菌产孢量为3.44×10^9 CFU/mL，高于对照组的3.25×10^9 CFU/mL；高岭土与膨润土次之，产孢量分别为2.68×10^9 CFU/mL和1.53×10^9 CFU/mL，与对照差异显著（P<0.001）。而硅藻土的生物相容性最差，其产孢量仅为其他处理的约十分之一。在悬浮性能方面，硅胶、高岭土、膨润土和硅藻土的悬浮率依次为70%、75%、52%和64%，其中高岭土的悬浮率最高，且符合相关标准要求。综合生物相容性、悬浮率、经济成本及实际操作等因素，最终确定高岭土为该可湿性粉剂的最佳载体。

三种润湿剂的润湿时间测定结果如表6所示。所有润湿剂的润湿时间均小于1 min，符合标准要求。其中，吐温80的润湿时间最短，在5%浓度下约为10 s，显著优于其他处理（P<0.001）。从生物相容性来看（图4-F–I、图4-W），吐温80处理下病原菌的菌落直径与对照组相同；其产孢量为2.39×10^9 CFU/mL，显著高于吐温20处理下的2.08×10^9 CFU/mL（P<0.001）。此外，病原菌在PEG2000处理下无法生长。因此，综合润湿性能与生物相容性，最终选择吐温80作为可湿性粉剂的润湿剂。

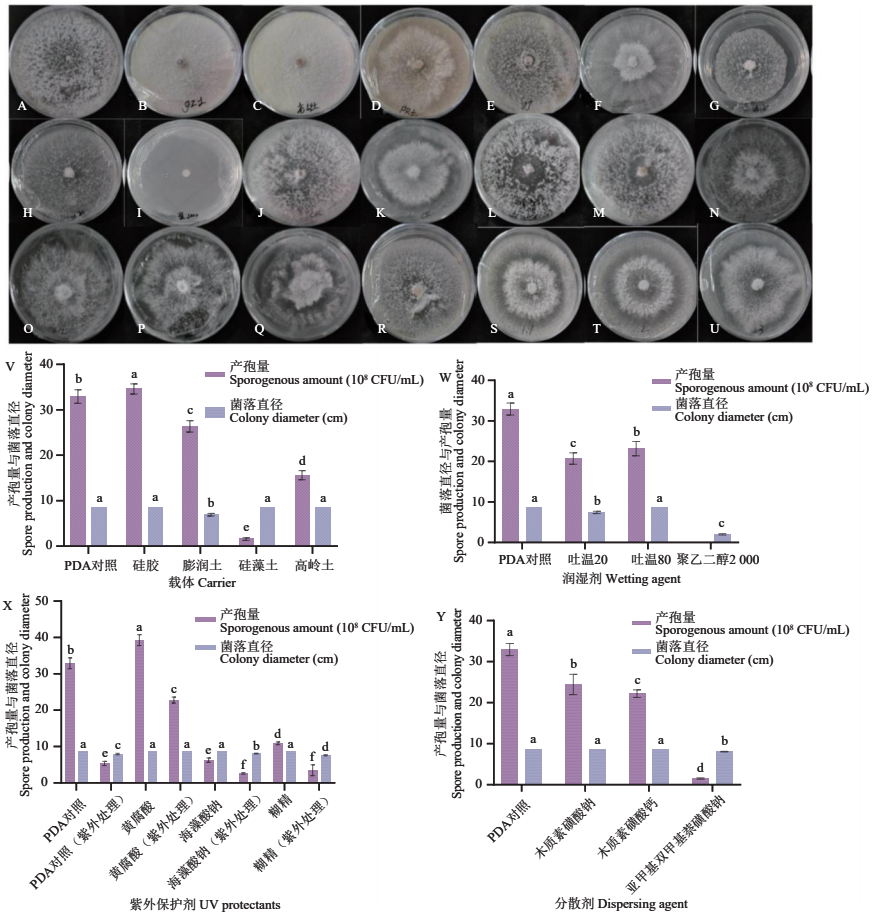
紫外保护剂的初筛结果如图4-J–Q和图4-X所示。与对照组相比，黄腐酸的紫外保护效果最为显著，在紫外处理后产孢量从3.96×10^9 CFU/mL下降至2.25×10^9 CFU/mL，显著优于海藻酸钠和糊精（P<0.001）。此外，黄腐酸还对病原菌的产孢具有一定促进作用，在黄腐酸处理下病原菌产孢量还要高于对照组的3.25×10^9 CFU/mL。因此，确定选用黄腐酸作为紫外保护剂。

三种分散剂对大豆间座壳菌SC02产孢量的影响结果如图4-R–U及图4-Y所示。分散剂中木质素磺酸钠和木质素磺酸钙处理下的菌落生长直径均与对照组相同。然而，木质素磺酸钠处理组的产孢量更高，达2.5×10^9 CFU/mL，较木质素磺酸钙处理组高出0.34×10^9 CFU/mL（P<0.001）。亚甲基双甲基萘磺

表5 化学除草剂单剂筛选结果

Table 5 Screening results of individual chemical herbicide

化学除草剂 Chemical herbicides	推荐浓度 Recommended concentration	死亡率 Mortality rate (%)	死亡时间 Time of death (d)	死亡症状 Symptoms of death
20%氯氟吡氧乙酸	1 μL/mL	100	4	全株死亡,茎秆叶片全部萎蔫枯死
25%环嗪酮SL	0.02 g/mL	100	8	全株死亡,但有少量叶片茎秆泛绿,短时间未完全失活
41%草甘膦异丙铵盐	0.02 g/mL	100	6	全株死亡,但部分茎秆短时间未失活
48%三氯吡氧乙酸丁氧基乙酯EC	10 μL/mL	90	9	大部分植株枯死,但有少量植株茎秆存活
10%精草胺膦胺盐	10 μL/mL	100	8	全株死亡,茎秆叶片全部萎蔫枯死
24%烯草酮	1 μL/mL	100	5	全株死亡,茎秆叶片全部萎蔫枯死
20%二甲四氯水剂	5 μg/mL	100	4	全株死亡,茎秆叶片全部萎蔫枯死



A-E:载体(CK、硅藻土、高岭土、膨润土、硅胶)筛选结果;F-I:润湿剂(CK、吐温20、吐温80、PEG2000)筛选结果;J-Q:紫外保护剂(CK、紫外处理CK、黄腐酸、紫外处理黄腐酸、海藻酸钠、紫外处理海藻酸钠、糊精、紫外处理糊精)筛选结果;R-U:分散剂(CK、木质素磺酸钠、木质素磺酸钙、亚甲基双甲基萘磺酸钠)筛选结果;V-Y:载体、润湿剂、紫外保护剂、分散剂筛选结果

A-E: Carrier (CK, diatomaceous earth, kaolin, bentonite, silica gel) screening results. F-I: Wetting agent (CK, Tween 20, Tween 80, PEG 2000) screening results. J-Q: Ultraviolet protection agent (CK, UV-treated CK, humic acid, UV-treated humic acid, sodium alginate, UV-treated sodium alginate, dextrin, UV-treated dextrin) screening results. R-U: Dispersant (CK, sodium lignosulfonate, calcium lignosulfonate, methylene bis-naphthalenesulfonate) screening results. V-Y: Screening results for carrier, wetting agent, ultraviolet protection agent, and dispersant

图4 载体与3种助剂筛选结果

Fig. 4 Screening results for carriers and three adjuvants

表6　不同润湿剂润湿时间测定

Table 6　Determination of wetting time of different wetting agents

润湿剂 Wetting agents	润湿时间 Wetting time (±SE) (s)		
	1%	3%	5%
吐温20 Tween 20	32±0.58b	20±0.52b	11±1.88b
吐温80 Tween 80	24±0.68c	14±1.28c	10±0.75b
PEG2000	54±0.78a	45±1.05a	36±0.62a

酸钠处理组的产孢量仅为0.16×10^9 CFU/mL，显著低于木质素磺酸钠。综合以上结果，木质素磺酸钠在维持菌落生长的同时表现出更优的促进产孢能力，因此被选定为本制剂的分散剂。

2.4.2　助剂配比筛选结果　由图5结果表明，第4组与第7组处理下的病原菌菌落直径保持在7 cm左右，显著高于其他处理组的2–3 cm，并且第7组处理的产孢量为1.79×10^9 CFU/mL，显著优于第4组的1.47×10^9 CFU/mL（P<0.001），因此确定序号7所对应的组合（润湿剂3%、分散剂1%、紫外保护剂0.9%）为最佳配方（图5）。

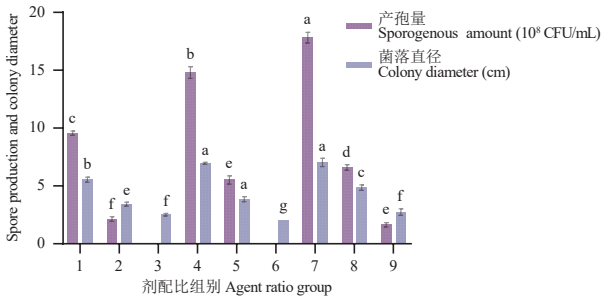


图5　三种助剂最佳配比筛选结果

Fig. 5　Screening results of the optimal ratio of three additives

2.4.3　可湿性粉剂复配剂质量检测　检测结果参见表7，制剂活孢子含量为1.65×10^9 CFU/g，润湿时间、悬浮率、pH、细度、起泡性、干燥减量、贮存稳定性各项指标均符合相关国家标准（NY/T 2293.1-2012）。

综上，得到了一种大豆间座壳菌SC02的复配可湿性粉剂，包含40%的SC02孢子液（1×10^9 CFU/mL）、3%润湿剂吐温80、1%分散剂木质素磺酸钠、0.9%紫外保护剂黄腐酸、7%载体高岭土、0.5 μL/mL 20%氯氟吡氧乙酸。

表7　大豆间座壳菌SC02可湿性粉剂复配剂质量检测结果

Table 7　Quality test results of wettable powder mixture of *D. sojae* SC02

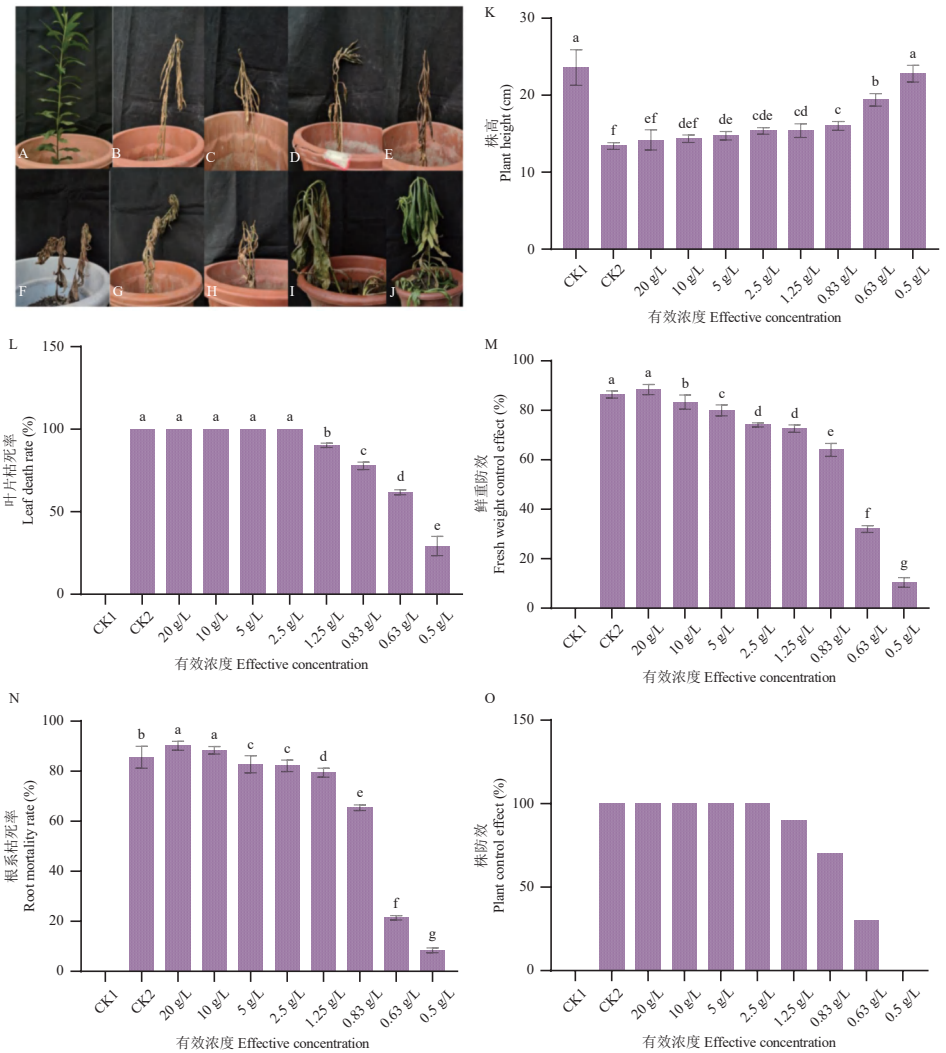
指标 Index	国家标准值 National standards	测量值 Measured value
润湿时间 Wetting time (s)	≤180	36±1
悬浮率 Suspensibility (%)	≥70	74
含孢量 Spore content (CFU/g)	–	1.65×10^9
pH	5.0–8.0	6.5
细度 Fineness (%)	≥90	92
起泡性 Frothiness (mL)	≤10 mL	7 mL
干燥减量 Drying reduction (%)	≤6	5.65
贮存稳定性 Storage stability (%)	≥80	≥81.5

2.5　盆栽防效试验

如图6所示，接种20 d后，大豆间座壳菌SC02可湿性粉剂复配剂在不同浓度下对加拿大一枝黄花均表现出良好的防治效果。喷药处理的植株在所有生物量指标（株高、叶片数量、鲜重、根系）上均显著降低（P<0.001），表明制剂严重抑制了植株的生长。由图6-K–O可知，在2.5 g/L及以上浓度时，目标杂草致死率可达100%，且在此高浓度区间，其防治效果优于化学除草剂对照组。在低浓度区间（0.5–0.63 g/L），药效显著下降，致死率仅维持在30%及以下。从株高变化可见，低浓度区间植株株高接近清水处理组，说明植株在处理后即使受到损伤，也依然能够恢复，表明该浓度范围不适合用于实际防治。而浓度在0.83–1.25 g/L下，该复配剂对加拿大一枝黄花的株防效为70%–90%，鲜重防效达63%–73%，根系枯死率为65%–80%，仍表现出良好的抑制效果，可导致植株最终死亡。同时，在所有处理组下，发生显著变化的梯度均在0.83 g/L浓度以下，说明制剂药效在0.83 g/L浓度后呈梯度递减趋势。

3　讨论

加拿大一枝黄花是一种危害严重的外来入侵植物，具有生长迅速、传播能力强和抗逆性高等特点[38]。目前，化学防治因其高效性仍是控制该入侵种的主要手段。草甘膦作为内吸型除草剂的代表，被广泛用于加拿大一枝黄花的防除。叶梅荣等[39]使用7.5 mL/L 41%草甘膦水剂处理加拿大一枝黄花



A–J:CK1清水、CK2氯氟吡氧乙酸,20、10、5、2.5、1.25、0.83、0.63、0.5 g/L稀释浓度处理效果;K–O:盆栽防治试验中株高、叶片枯死率、鲜重防效、根系枯死率、株防效结果

A–J: CK1 distilled water, CK2 clopyralid, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.83, 0.63, 0.5 g/L dilution concentration treatment effect. K–O: Plant height, leaf necrosis rate, fresh weight control effect, root necrosis rate, and plant control effect results in potted control trials

图6 盆栽试验结果

Fig. 6 Results of the pot experiments

30 d后，其对地上部和根系的鲜重防效分别达到71.94%和68.33%，株防效为87.22%。然而，加拿大一枝黄花常入侵人类活动频繁的区域，如田边、林缘和路旁，草甘膦的非选择性灭杀特性易对周边作物、人畜及环境造成负面影响。本研究选用氯氟吡氧乙酸作为化学防治药剂，其对加拿大一枝黄花的鲜重防效超过80%，株防效达90%以上，效果优于前人研究结果，且在保证高效防控的同时对环境更友好。此外，生物防治作为化学防治的替代策略也显示出潜力。前人研究发现，齐整小核菌SC64菌株对入侵植物加拿大一枝黄花具有较强的致病性，所制备的生物农药在施药28 d后株防效为43%–71%，但其效果易受空气湿度制约[40]。本研究从加拿大一枝黄花植株中分离出大豆间座壳菌SC02，该菌株稳定性更高、致病速度更快，在适宜条件下最快15 d即可引起全面发病，表现出良好的应用前景。

单一化学防治或生物防治均存在一定局限性，因此，复配使用已成为目前防控入侵植物的主流策

略。例如，单独使用氯氟吡氧乙酸时，加拿大一枝黄花的根腐率最高仅为58%；而与草甘膦异丙胺盐复配后，根内药剂浓度显著提高，根腐率提升至80%，但该研究对地上部分的防效不佳，仅为30%[41]。与之相比，本研究将氯氟吡氧乙酸与病原真菌大豆间座壳菌SC02复配使用，该复配处理在根腐率上达到了80%以上的同等优异效果，同时叶片枯死率达90%以上，表明其对地上与地下部分均具有优良的防控效果。该复配处理综合株防效达90%，复发率显著降低，防治效果突出，同时使化学除草剂用量减少50%，进一步证明了生物辅助策略在除草剂研发与应用中的重要作用。通过分离、纯化与专一致病性测定，本研究成功获得一株对加拿大一枝黄花具有强致病性的大豆间座壳菌菌株。在此基础上，系统筛选了载体、紫外保护剂、分散剂、润湿剂及化学除草剂，并通过正交试验优化配比，最终确定可湿性粉剂的配方为：3%吐温80、1%木质素磺酸钠、0.9%黄腐酸、0.5 μL/mL的20%氯氟吡氧乙酸、7%高岭土，以及40%浓度为1×10^9 CFU/mL的SC02菌株孢子液。该制剂经验证符合国家相关标准。与现有研究相比，本试验将化学除草剂与致病真菌复配使用，丰富了对加拿大一枝黄花的防治选择，在保证优良防效的同时，显著降低了化学除草剂用量，减轻了环境负担，延长了药剂持效期。该复配制剂在浓度为0.83–1.25 g/L时对加拿大一枝黄花的株防效可达90%，鲜重防效为73%，相比单一化学除草剂氯氟吡氧乙酸具有污染小、效果更持久的优势。

4　结论

大豆间座壳菌SC02能有效防治加拿大一枝黄花，将其与化学除草剂20%氯氟吡氧乙酸复配制成可湿性粉剂后，对加拿大一枝黄花的株防效达90%，鲜重防效为73%，防除效果良好，应用前景广阔。

参考文献

[1] 鞠瑞亭, 李慧, 石正人, 等. 近十年中国生物入侵研究进展 [J]. 生物多样性, 2012, 20(5): 581-611.
Ju RT, Li H, Shi ZR, et al. Progress of biological invasions research in China over the last decade [J]. Biodivers Sci, 2012, 20(5): 581-611.

[2] Theoharides KA, Dukes JS. Plant invasion across space and time: factors affecting nonindigenous species success during four stages of invasion [J]. New Phytol, 2007, 176(2): 256-273.

[3] 杨昌洪, 肖晓华, 刘春, 等. 噬菌核霉可湿性粉剂防治油菜菌核病试验示范 [J]. 南方农业, 2016, 10(19): 19-21.
Yang CH, Xiao XH, Liu C, et al. Experimental demonstration on control of *Sclerotinia sclerotiorum* with wettable powder [J]. South China Agric, 2016, 10(19): 19-21.

[4] 陈娥. 顶孢霉可湿性粉剂和微粉剂的药效评价及田间应用技术研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.
Chen E. Evaluation and field application technology of WP and MDP of *Acremonium hansfordii* [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2016.

[5] 王均伟, 黄晓慧, 杨然迪, 等. 草甘膦与新型原卟啉原氧化酶抑制剂X18002复配减量应用研究 [J]. 农药学学报, 2023, 25(4): 817-828.
Wang JW, Huang XH, Yang RD, et al. Study on usage reduction of glyphosate mixed with a novel protoporphyrinogen oxidase inhibitor-X18002 [J]. Chin J Pestic Sci, 2023, 25(4): 817-828.

[6] 何丽烂, 区焯林, 王芳, 等. 尖孢镰刀菌与草甘膦复配对空心莲子草防御酶的影响 [J]. 广东农业科学, 2011, 38(22): 78-79, 86.
He LL, Ou ZL, Wang F, et al. Influence of *Fusarium oxysporum* mixed with Glyphosate on *Alternanthera philoxeroides* defense enzymes [J]. Guangdong Agric Sci, 2011, 38(22): 78-79, 86.

[7] 李鑫, 郭冉, 杨娟, 等. 黏质沙雷氏菌Ha1培养条件优化及其与化学除草剂复配研究 [J]. 杂草学报, 2020, 38(2): 21-32.
Li X, Guo R, Yang J, et al. Optimization of culture conditions of *Serratia marcescens* Ha1 and its compounding with herbicides [J]. J Weed Sci, 2020, 38(2): 21-32.

[8] 商美妮. 木霉固体发酵培养条件优化及含木霉生物基质育苗效应研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
Shang MN. Study on optimization of solid fermentation culture conditions of *Trichoderma* and the effect of biological substrate containing *Trichoderma* on seedling growth [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020.

[9] 翟森, 靳文涛, 柳丽杰, 等. 龙泉山森林公园入侵植物加拿大一枝黄花的调查及风险性分析 [J]. 安徽农业科学, 2025, 53(9): 118-122.
Zhai S, Jin WT, Liu LJ, et al. Investigation and risk analysis of invasive plant *Solidago canadensis* in longquanshan forest park [J]. J Anhui Agric Sci, 2025, 53(9): 118-122.

[10] 王前程, 张迎迎, 戴陶宇, 等. 拟康宁木霉T-51菌株对番茄枯萎病的生物防治及其机理研究 [J]. 西北植物学报, 2022, 42(6): 974-982.
Wang QC, Zhang YY, Dai TY, et al. Study on biological control effect and mechanism of *Trichoderma koningiopsis* T-51 on tomato *Fusarium* wilt [J]. Acta Bot Boreali Occidentalia Sin, 2022, 42(6): 974-982.

[11] 袁树忠, 何平平, 廉吉衷, 等. 一种镰刀菌对空心莲子草的致病力与寄主专一性测定 [J]. 中国生物防治, 2006(2): 137-141.

Yuan SZ, He PP, Lian JZ, et al. Host range and pathogenicity of a *Fusarium* species to *Alternanthera philoxeroides* [J]. Chin J Biol Control, 2006(2): 137-141.

[12] 李思, 尚晓静, 张富美, 等. 蓝莓根部内生木霉分离鉴定及其拮抗作用 [J]. 核农学报, 2022, 36(8): 1569-1578.
Li S, Shang XJ, Zhang FM, et al. Diversity of endophytic *Trichoderma* in the roots of blueberries and its antagonistic effects [J]. J Nucl Agric Sci, 2022, 36(8): 1569-1578.

[13] 司璐, 吴彤, 甄锦程, 等. 大兴安岭凋落物中可培养真菌分离、鉴定及活性筛选 [J]. 中国农学通报, 2022, 38(26): 118-123.
Si L, Wu T, Zhen JC, et al. Isolation, identification and activity screening of culturable fungi from litter in the greater Hinggan Mountains [J]. Chin Agric Sci Bull, 2022, 38(26): 118-123.

[14] 闫佳佳, 万璐, 尤梦瑶, 等. 产香兰素内生真菌GP20的鉴定及发酵条件研究 [J]. 中国调味品, 2022, 47(11): 44-49.
Yan JJ, Wan L, You MY, et al. Study on identification and fermentation conditions of vanillin-producing endophytic fungus GP20 [J]. China Condiment, 2022, 47(11): 44-49.

[15] 巨亚雯, 陈亚丽, 徐蓬, 等. 植物生长调节剂与磺酰脲类除草剂混用对防除麦田杂草的协同增效作用 [J]. 杂草学报, 2022, 40(4): 43-49.
Ju YW, Chen YL, Xu P, et al. Synergistic interaction of plant growth regulators mixed with sulfonylurea herbicides on weeding in wheat fields [J]. J Weed Sci, 2022, 40(4): 43-49.

[16] 张英财, 农向群, 张泽华, 等. 18种化学农药与绿僵菌相容性研究 [J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(2): 186-191.
Zhang YC, Nong XQ, Zhang ZH, et al. Compatibility of eighteen chemical pesticides with *Metarhizium anisopliae* [J]. Chin J Biol Control, 2012, 28(2): 186-191.

[17] 朱文珊. 长枝木霉拌种对芸豆生长及根际土壤酶活性的影响 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2022.
Zhu WS. Effects of seed dressing in *Trichoderma longibrachiatum* on kidney bean growth and enzyme activities in rhizosphere soil [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2022.

[18] 何祖传, 周健, 张洪泉, 等. 化学除草剂对加拿大一枝黄花的防除效果试验 [J]. 现代农业科技, 2020(10): 82, 88.
He ZC, Zhou J, Zhang HQ, et al. Effect of chemical herbicide on *Solidago canadensis* L [J]. Mod Agric Sci Technol, 2020(10): 82, 88.

[19] 韩敏, 张海艳, 洪爱梅, 等. 几种除草剂对加拿大一枝黄花的防除效果评价 [J]. 世界农药, 2024, 46(10): 56-62.
Han M, Zhang HY, Hong AM, et al. Evaluation of the control effects of several herbicides on *Solidago canadensis* [J]. World Pestic, 2024, 46(10): 56-62.

[20] 王博, 李嘉, 马莉莉, 等. 异丙甲草胺乳油不同用量防治玉米田禾本科杂草田间药效试验 [J]. 云南农业科技, 2021(5): 36-38.
Wang B, Li J, Ma LL, et al. Field experiments of metolachlor EC with different amounts on grassy weeds in corn field [J]. Yunnan Agric Sci Technol, 2021(5): 36-38.

[21] 咸洪泉, 李雅华. 木霉菌株Td31代谢产物对立枯丝核菌的拮抗作用 [J]. 沈阳农业大学学报, 2009, 40(5): 566-570.
Xian HQ, Li YH. The antagonism of metabolite by Trichoderma. Td31 to *Rhizoctonia solani* [J]. J Shenyang Agric Univ, 2009, 40(5): 566-570.

[22] 孙文. 短短芽胞杆菌ch2-22发酵动力学与水分散粒剂的研究 [D]. 天津: 河北工业大学, 2017.
Sun W. Study on fermentation kinetics of *Brevibacillus brevis* Ch2-22 and preparation of water dispresible granule [D]. Tianjin: Hebei University of Technology, 2017.

[23] 陈慧. 绛红褐链霉菌颗粒剂的研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
Chen H. Reseach of granule formulation for *Streptomyces* purpeofuscus [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2015.

[24] 古丽君, 徐秉良, 张德瑞, 等. 深绿木霉病原菌制剂加工工艺研究: 中国植物保护学会2009年学术年会[C], 武汉, 2009.
Gu LJ, Xu BL, Zhang DR, et al. Study on Processing Technology of *Trichoderma atroviride* Pathogen Preparation[C]. Proceedings of the 2009 Annual Conference of the China Society of Plant Protection, Wuhan, 2009.

[25] 戴启星. 长枝木霉T6菌株可湿性粉剂研制及复配菌剂协同增效作用研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2019.
Dai QX. Development of *Trichoderma longibrachiatum* T6 wettable powder and synergistic compounding agents [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2019.

[26] 邹益泽. 草茎点霉水分散粒剂的研发及其对鸭跖草防除效果研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019.
Zou YZ. Development of *Phoma herbarum* WG and its control effect against *Commelina communis* L. [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2019.

[27] 王建锋, 陆宁海. 木霉菌在农业中的研究与应用前景 [J]. 安徽农学通报, 2008, 14(14): 41-43, 136.
Wang JF, Lu NH. Rogress in agriculture research with *Trichoderma* [J]. Anhui Agric Sci Bull, 2008, 14(14): 41-43, 136.

[28] 叶素丹, 冯明光. 生防真菌耐旱特性的生理生化基础及其利用 [J]. 应用生态学报, 2004, 15(12): 2383-2387.
Ye SD, Feng MG. Physiological and biochemical bases of xero-tolerance of fungal biocontrol agents and their application [J]. Chin J Appl Ecol, 2004, 15(12): 2383-2387.

[29] 杨肖. 金龟子绿僵菌和小檗碱复配及其可湿性粉剂和水分散粒剂的制备 [D]. 北京: 北京化工大学, 2021.
Yang X. Preparation of *Metarhizium anisopliae* and berberine and their wettable powder and water dispersible granuie [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2021.

[30] 农药可湿性粉剂润湿性测定方法: GB/T 5451-2001 [S]. 2001.

Test method for wettability of pesticide wettable powders: GB/T 5451-2001 [S]. 2001.

[31] 农药可湿性粉剂悬浮率剂测定方法: GB/T 14825-1993 [S]. 1993.
Test method for suspensibility of pesticide wettable powders: GB/T 14825-1993 [S]. 1993.

[32] 冯月. 木霉菌株产酶培养及其特定底物酶解过程研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2012.
Feng Y. Studies on cellulase-produced fermentation of *Trichoderma* strains and enzymatic hydrolysis of the specific substrate [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2012.

[33] 农药pH值的测定方法: GB/T 1601-1993 [S]. 1993.
Test method for pH value of pesticides: GB/T 1601-1993 [S]. 1993.

[34] 国家技术监督局. 农药粉剂、可湿性粉剂细度测定方法: GB/T 16150—1995 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
State Bureau of Quality and Technical Supervision of the People's Republic of China. Seive test for dustable and wettable powders of pesticides: GB/T 16150—1995 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2004.

[35] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 农药持久起泡性测定方法: GB/T 28137-2011 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Testing method of persistent foaming for pesticides: GB/T 28137-2011 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2012.

[36] 农药干燥减量的测定方法: GB/T 30361-2013 [S]. 2013.
Test method for drying reduction of pesticides: GB/T 30361-2013 [S]. 2013.

[37] 周欣欣, 张宏军, 张佳, 等. 除草剂田间药效试验申请应注意的几个问题 [J]. 农药科学与管理, 2012, 33(7): 8-12.
Zhou XX, Zhang HJ, Zhang J, et al. Several problems that should be paid attention to in the application of herbicide field efficacy test [J]. Pestic Sci Adm, 2012, 33(7): 8-12.

[38] 常悦, 李玉静, 李周旭, 等. 基于Maxent和ArcGIS加拿大一枝黄花适生区预测 [J]. 农学学报, 2024, 14(3): 40-47.
Chang Y, Li YJ, Li ZX, et al. Prediction of suitable growing areas of *Solidago canadensis* L. based on maxent and ArcGIS [J]. J Agric, 2024, 14(3): 40-47.

[39] 叶梅荣, 刘庆安, 马纪忠, 等. 41%草甘膦水剂对加拿大一枝黄花的防除效果 [J]. 江苏农业科学, 2010, 38(2): 130-132.
Ye MR, Liu QA, Ma JZ, et al. Controlling effects of 41% glyphosate aqueous solution on *Solidago canadensis* L [J]. Jiangsu Agric Sci, 2010, 38(2): 130-132.

[40] 李玲燕. 生物除草剂齐整小核菌SC64颗粒剂的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
Li LY. A study on solid granule of bioherbicide *Sclerotium rolfsii* strain SC64 [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015.

[41] 曹晶晶, 谷涛, 张自常, 等. 防除不同生境下加拿大一枝黄花的除草剂研究 [J]. 杂草学报, 2024, 42(4): 82-90.
Cao JJ, Gu T, Zhang ZC, et al. Research on herbicides for controlling *Solidago canadensis* L. in different habitats [J]. J Weed Sci, 2024, 42(4): 82-90.

（责任编辑　朱琳峰）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):282-292

基于改进YOLOv8的绿豆叶片主要病害检测研究

王超[1,2] 杨钰超[1] 郭思宇[1] 贾瑶镟[1] 陈艳霞[1] 赵钰[1,2] 乔星星[1,2]
肖璐洁[1,2] 冯美臣[1,2] 杨武德[1,2*]
（1.山西农业大学农学院,太谷 030801；2.山西农业大学省级智慧农业学院,太谷 030801）

摘 要：【目的】为解决自然环境中绿豆叶片病害检测场景复杂、检测精度不足、小目标检测能力较弱等问题，提出一种YOLOv8-EMA-CARAFE-Layer的深度学习算法。【方法】在主干网络中引入了高效多尺度注意力机制（efficient multi-scale attention, EMA），提升模型对病害特征的提取与筛选能力；在颈部网络中采用CARAFE（Content-Aware ReAssembly of FEatures）上采样模块，通过动态生成上采样核增强全局信息聚合能力，从而提高特征重建精度；在Neck和Head网络中添加一个小目标检测层，提升对细小病害目标的检测性能。【结果】改进后的模型在mAP@50、精确度和召回率等关键指标上分别达到了91.0%、86.9%、83.4%，且与主流目标检测模型YOLOv3、YOLOv5、YOLOv6和YOLOv11相比，平均精度mAP@50分别提升了6.8%、0.3%、13.5%和1.6%，在包含复杂田间背景的混合数据集上，表现出较强的绿豆叶片病害检测性能；此外，模型通过轻量化设计保持了较低的参数量，仅为5.95 Mb。【结论】YOLOv8-EMA-CARAFE-Layer模型能够满足无人机、智能农机等移动终端的部署需求，在现有的田间混合数据集上，对提高绿豆叶片主要病害的快速、高效、精准检测水平具有实际应用借鉴价值。

关键词： 图像识别；深度学习；YOLOv8；绿豆叶片病害；高效多尺度注意力机制
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1295

Research on Detection of Major Diseases in Mung Bean Leaves Based on an Improved YOLOv8

WANG Chao[1,2] YANG Yu-chao[1] GUO Si-yu[1] JIA Yao-xuan[1] CHEN Yan-xia[1] ZHAO Yu[1,2] QIAO Xing-xing[1,2]
XIAO Lu-jie[1,2] FENG Mei-chen[1,2] YANG Wu-de[1,2*]
（1. *College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu* 030801; 2. *Provincial-Level College of Smart Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu* 030801）

Abstract: 【Objective】To address issues such as complex detection scenarios, insufficient detection accuracy, and weak small-target detection capability for mung bean leaf diseases in natural environments, this study proposes a deep learning algorithm named YOLOv8-EMA-CARAFE-Layer. 【Method】The EMA (efficient multi-scale attention) mechanism was introduced into the backbone network to enhance the model's ability to extract and screen disease features. The CARAFE (Content-Aware ReAssembly of FEatures) upsampling module was adopted in the neck network, which enhanced global information aggregation capability by dynamically generating upsampling kernels, thereby improving feature reconstruction accuracy. A small-target detection layer was added to the neck and head networks to improve the detection effectiveness for minute disease targets. 【Result】The improved model achieved a mAP@50 of 91.0%, a precision of 86.9%, and a recall of 83.4%. Compared with mainstream object detection models YOLOv3, YOLOv5, YOLOv6, and YOLOv11, the mAP@50 improved by 6.8%, 0.3%, 13.5%, and 1.6% respectively, demonstrating superior performance in mung bean leaf disease detection. Furthermore, through lightweight design, the model maintained a low parameter count of only 5.95 MB. 【Conclusion】YOLOv8-EMA-CARAFE-Layer model enables deployment on mobile terminals such as drones and smart agricultural machinery, offering practical application value for enhancing the rapid,

收稿日期：2025-11-27
基金项目：国家重点研发项目子课题（2021YFD1600603-03, 2021YFD1600603-02）
*通信作者：杨武德 sxauywd@126.com

efficient, and accurate detection of major diseases in mung bean leaves.

Keywords: image recognition; deep learning; YOLOv8; mung bean leaf diseases; efficient multi-scale attention mechanism

绿豆作为我国重要的粮食与经济作物，其种植历史悠久且营养丰富，市场需求持续增长[1-2]。然而，绿豆生产常受细菌性疫病、叶斑病等威胁[3]。依赖人工经验进行病害判断、识别和鉴定病害的手段，存在效率低、成本高、对专业知识依赖强及易漏检误检等局限[4]。故研发高效精准的绿豆叶片病害自动检测技术，对提升检测效率、保障绿豆安全生产具有重要的现实需求和实践意义。

基于机器视觉与传统机器学习的方法虽部分提升了检测效率，但存在特征提取复杂、鲁棒性差等局限[5-8]。深度学习技术凭借其自动特征学习和高效检测的优势，已成为植物病害检测的主流方法[9]。其中，YOLO系列因检测速度快、精度高、计算资源需求低，在病害检测中应用最为广泛[10-11]。改进的YOLOv3、YOLOv5等模型在多种作物病害检测中表现出色，但普遍面临复杂环境下小目标检测精度不足、模型泛化能力弱或计算成本高等问题[12-15]。而YOLOv8作为YOLO系列的迭代版本，不仅具备了前代系列模型检测速度快、精度高的优势，也通过优化网络结构进一步平衡了检测性能与模型复杂度，其轻量化版本YOLOv8n更具备参数量小、推理效率高的特点，有效克服了模型规模过大，导致资源适配性差或泛化能力不足的问题[16-17]。当前在复杂田间环境下进行绿豆叶片病害检测的方法，仍面临三方面严峻挑战：（1）病害特征易受叶脉、光影等背景干扰；（2）病斑边界细节模糊，传统上采样难以精准重建；（3）小尺度病斑密集分布，易造成尺度不一致的信息丢失和漏检。此外，模型在轻量化设计与边缘设备部署效率方面亦有待优化，制约了其实际应用[18-19]。

针对上述问题，本研究以轻量化的YOLOv8n为基线，创新性地设计EMA-CARAFE-小目标检测层的特定组合。该组合的选择是针对绿豆叶片病害图像的具体特点进行考量：EMA高效多尺度注意力机制能够通过跨维度交互和低参数开销有效抑制背景噪声并捕捉多尺度病斑特征；CARAFE内容感知上采样模块动态生成核，适合重建低对比度、模糊边界的病斑细节；专用小目标检测层则通过高分辨率特征重采样，直接弥补小尺度病斑的信息丢失。这种互补协同的组合设计旨在在复杂田间背景的混合数据集上，实现绿豆叶片病害的高精度、轻量化检测。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　绿豆叶片病害图像采集　针对绿豆叶片公开病害数据集的匮乏，本研究于2024年7-9月，在山西省多个产区（附图1）采集了4 078张细菌性疫病（1 386张）、叶斑病（1 123张）、轮纹病（594张）及健康叶片（975张）的图像。图像采用智能手机（手机像素6 240×4 160）和佳能Mark III数码相机拍摄，为增强数据集的环境代表性，采集过程涵盖了多种实际田间条件，包括不同光照强度、天气状况、拍摄角度与距离以及背景杂乱程度。对数据集中的模糊、重复及不符合标注要求的图像进行剔除，并通过旋转、翻转、亮度调整等数据增强技术扩充样本。此外，本研究基于YOLOv8框架进行训练，该框架默认启用了针对目标检测任务的数据增强技术，包括Mosaic、MixUp、CopyPaste和HSV随机调整等。这些高级增强在YOLO系列中广泛应用，能显著提升模型对田间变异的鲁棒性。其中，Mosaic和CopyPaste有助于更好地捕捉细小密集病斑的空间关系和纹理细节；MixUp虽可能在混合时轻微模糊部分边界，但整体提高了模型对病斑与背景区分的泛化能力，未导致显著细节丢失，增强了数据针对性，缓解了田间复杂背景和病斑变异的挑战。针对数据集存在的类别不平衡问题，本研究在数据增强阶段特别对轮纹病加强了旋转、翻转和亮度调整等操作，以增加其样本多样性和数量占比，从而缓解类别不平衡对模型训练的影响。此外，YOLOv8训练过程默认采用自动类平衡策略，进一步减轻不平衡带来的偏差。此外，所有图像经预处理归一化至640×640分辨率，以保障后续模型训练稳定性与检测效果[20]，最终形成含3 927张图像的高质量混合数据集，各类病害图像表现及特征描述如图1和表1所示。

1.1.2　数据标注及预处理　采用LabelImg标注工具



A:细菌性疫病;B:叶斑病;C:轮纹病;D:健康

A: Bacterial blight; B: Leaf spot; C: Ring spot; D: Healthy

图1 绿豆病害图

Fig. 1 Images of mung bean leaves

对病斑区域定位并绘制边界框，生成xml格式文件，标签分别设为“health”（健康）、“ring spot”（轮纹病）、“leaf spot”（叶斑病）、“bacterial blight”（细菌性疫病）。标注完成后，将xml格式文件转换为YOLO训练所需的txt格式，按7∶2∶1比例随机划分数据集为训练集、测试集与验证集[21]。

1.2 方法

1.2.1 YOLOv8深度学习模型网络结构 YOLOv8是一种高效且稳健的目标检测算法[22]，其网络结构主要包含输入端（Input）、主干网络（Backbone）、颈部网络（Neck）和检测头（Head）4部分。输入端负责图像的预处理与自适应缩放。主干网络通过CBS结构、C2f及SPPF模块提取深层特征。颈部网络结合了PAN（路径聚合网络）与FPN（特征金字塔网络），以增强多尺度特征融合能力。检测头则采用解耦头与无锚框（anchor-free）策略，在不同尺度上并行预测目标类别与位置。其整体网络结构如图2所示。

表1 绿豆叶片病害种类及特征

Table 1 Types and characteristics of mung bean leaf diseases

病害名称 Disease types	病害特征 Disease characters
细菌性疫病 Bacterial blight	初期叶片表面出现小的水浸斑，变成淡黄色到棕褐色；后期病斑在叶片上扩展，病斑呈黑色
轮纹病 Ring spot	初期叶片产生小的、褐色圆形病斑；后期发展成大的具有同心环的圆形或不规则的深褐斑
叶斑病 Leaf spot	初期叶片上出现小型不规则或圆形褐色斑点，边缘清晰；后期病斑扩展，形成大的不规则坏死区域
健康 Health	叶片呈深绿色，叶形卵状，叶脉清晰可见，质地柔软薄嫩，表面光滑

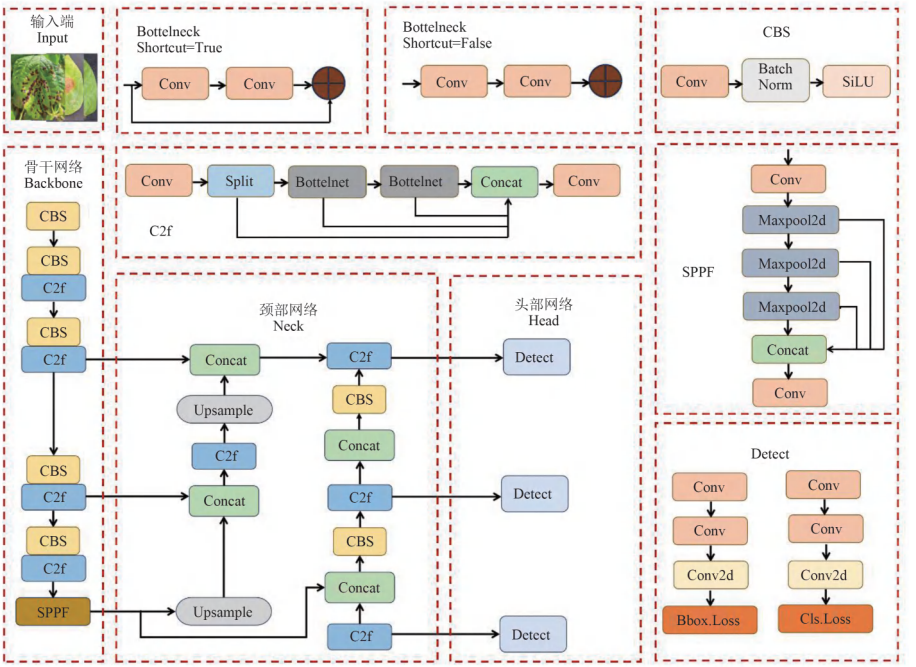


图2 YOLOv8模型网络结构

Fig. 2 YOLOv8 model network architecture

1.2.2　改进YOLOv8模型网络结构　YOLOv8n作为YOLOv8系列轻量化版本，检测速度快、精度较高且参数量小，适配移动设备部署[23]。但在复杂场景下小目标检测精度、特征融合能力及收敛速度仍有不足。故本研究以轻量化的YOLOv8n为基线，提出了YOLOv8-EMA-CARAFE-Layer改进模型。其主要改进包括三方面：（1）在骨干网络中引入EMA高效多尺度注意力机制，以强化病害特征的提取与筛选能力；（2）在颈部网络中使用CARAFE上采样模块替换原结构，增强特征重建中的细节保留；（3）在Neck与Head之间增加一个小目标检测层，以缓解尺度不一致造成的信息丢失，从而提升小病害目标的识别性能。改进后的模型结构如图3所示。

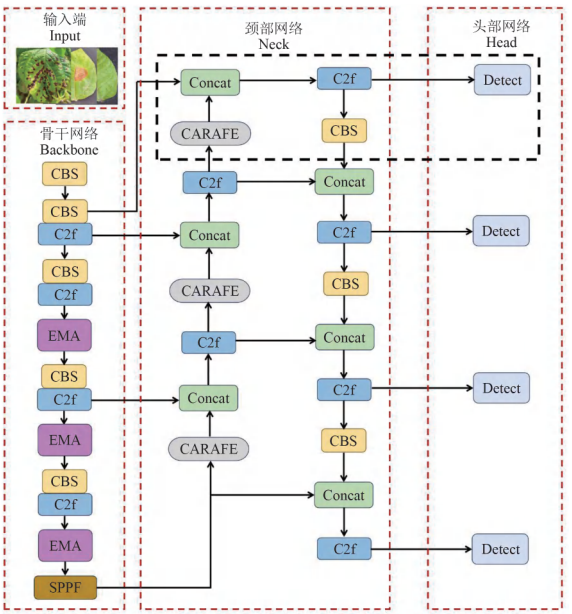


图3　YOLOv8-EMA-CARAFE-Layer网络结构

Fig. 3　YOLOv8-EMA-CARAFE-Layer network architecture

（1）EMA高效多尺度注意力机制。绿豆叶片病害特征复杂、病斑形态差异大，且叶脉、光影等背景易致漏检误检，故在YOLOv8n主干网络引入EMA机制[24-25]。EMA的设计核心包括特征分组、并行子网和跨空间学习3部分。首先特征分组将输入特征图通道维度划分为多子特征组，通过独立注意力权重捕捉不同语义信息，且通过通道–批处理维度重塑避免信息丢失。其次，分组后特征被送入3条路径，2条1×1分支通过全局平均池化与共享权值1×1卷积学习跨通道交互，1条3×3分支通过局部卷积扩大感受野，提升多尺度特征表达。在跨空间学习阶段，EMA将1×1和3×3分支的输出特征融合，经二维全局平均池化编码空间信息，通过Softmax生成空间注意力图，最终以Sigmoid生成像素级权重，突出病害区域、压制背景噪声。图4所示为EMA注意力机制模块网络结构。

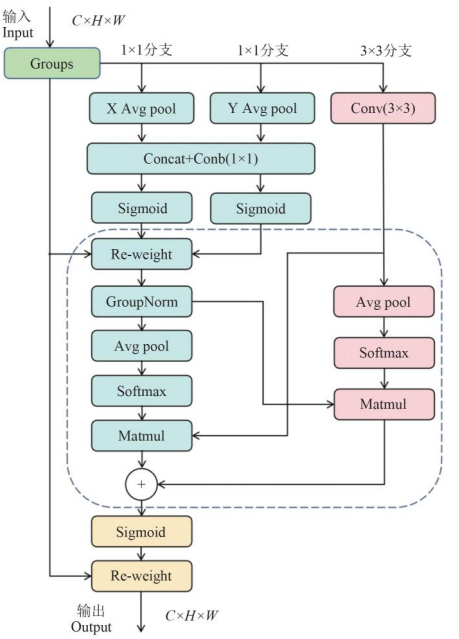


图4　EMA注意力机制模块网络结构

Fig. 4　EMA attention mechanism module network architecture

（2）CARAFE上采样。传统上采样仅依赖局部像素加权，无法捕捉病斑与背景的全局关联，导致绿豆小叶斑病特征重建不完整。故本研究在Neck网络采用CARAFE模块，通过动态生成上采样核实现全局信息聚合，图5为CARAFE的整体框架。

该模块的结构由内核预测模块（kernel prediction module）和特征感知重组模块（feature perception recombination moudle）两部分组成，通过高效的上采样操作，能够充分保留图像中的细节信息，从而提升模型对病害特征的识别能力。在内核预测模块中，输入特征图（H×W×C）经通道压缩降维至Cm，再通过kup×kup卷积内容编码生成σ2×kup2尺寸重组核，随后展开空间维度并重组为σH×σW上采

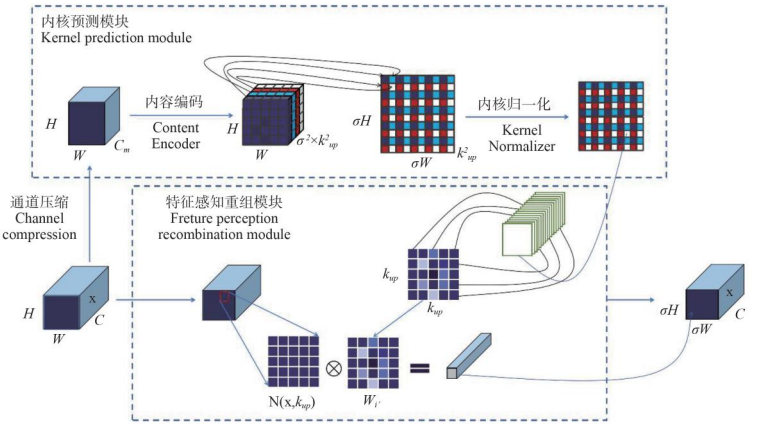


图5 CARAFE的整体框架

Fig. 5 Overall framework of CARAFE

样核，经Softmax归一化确保权重和为1，公式为：

$$C_m = \sigma^2 \times k_{up}^2 \quad (1)$$

其中σ表示上采样倍数，k_{up}为动态上采样核的大小。

特征感知重组模块中对输出特征图每个目标位置，取kup×kup特征区域与动态上采样核做点积，映射生成σH×σW×C最终特征图，通过动态权重聚合上下文信息，平衡特征建模精度与计算效率。

（3）添加小目标检测层。绿豆叶斑病等病害以细小斑点形式存在，现有模型小目标识别能力不足，故新增小目标检测层（图6），该检测层通过特征重采样将低层特征图上采样恢复高分辨率，与高层语义特征融合形成联合特征图，弥补下采样导致的细节丢失，再在融合特征图上引入独立小目标检测头，通过轻量化卷积增强特征表达，提升小目标检测准确率与召回率。

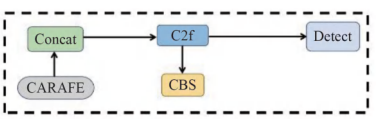


图6 小目标检测层

Fig. 6 Small object detection layer

1.2.3 模型训练与评价指标

（1）试验环境和参数设置。本试验的模型训练与测试均在同一实验环境下进行，处理器采用Intel（R）Core（TM）i7-8750H CPU @ 2.20 GHz，显卡为NVIDIA GeForce RTX 3090，显存容量为32 GB。操作系统为Windows 11，深度学习框架选用PyTorch2.0.1，计算架构基于CUDA 11.7，编程语言为Python3.8.0。训练参数方面，最大迭代轮次设置为300，批量大小为16，初始学习率为0.000 1。

（2）评价指标。评价指标可以全面衡量一个模型在不同任务中的性能表现[26]。本研究选择的评价指标有精确度（precision）、召回率（recall）和平均精度（mean average precision, mAP），这些指标为模型的检测能力提供全面而客观的评估[27]，其公式如下：

$$\text{Precision} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FP}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{Recall} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FN}} \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{mAP} = \frac{\sum_{i=1}^{c} \text{AP}(c)}{\text{C}} \times 100\% \quad (4)$$

式中，TP（true positive）表示正确识别病害的数量；FP（false positive）表示健康区域被错误识别为病害的数量；FN（false negative）代表判断错误为病害的数量；AP是精确查全率曲线（P-R曲线）下的面积；C为病害的种类。

1.2.4 模块协同机制 本研究所提出的改进方案，遵循从特征提取、特征融合到目标检测的完整流程，是针对绿豆叶片病害图像中背景复杂与小目标密集这两大特点所构建的系统性协同设计。EMA模块置于主干网络早期，通过跨空间学习与像素级注意力权重机制，有效抑制背景噪声干扰，并增强多尺度

病害特征的提取能力，为后续颈部网络提供更为纯净的输入；CARAFE模块接收经EMA增强后的特征，借助动态内容感知核实现全局上下文的自适应聚合，有助于重建小病斑区域的模糊边界与细节信息；而新增的小目标检测层，则充分融合前两个模块协同输出的鲁棒特征，通过高分辨率特征的重采样与融合，直接补偿小尺度病斑在常规检测中的信息损失。整体上，EMA承担前端特征的净化与筛选，CARAFE负责中端细节的重建，小目标检测层则完成后端尺度的补偿，三者沿特征流向逐级递进、功能互补，共同应对复杂背景下小目标病害的检测挑战。

2　结果

2.1　YOLOv8模型改进前后的性能对比试验

为验证改进模型性能，将YOLOv8-EMA-CARAFE-Layer与原始YOLOv8n在相同数据集上训练测试。由表2可知，改进后模型精确度、召回率分别提升1.4%、2.3%，mAP@50、mAP@50-95分别提升4.8%、4.7%，参数量仅增加0.22 MB。表明改进模型在特征提取方面更加高效，能够保留更多的细节信息，从而更准确地识别目标，同时减少漏检目标的数量。

表2　改进前后模型性能对比

Table 2　Model performance comparison before and after improvement

模型	精确度 Precision(%)	召回率 Recall(%)	mAP@50(%)	mAP@50-95(%)	参数量 Params(MB)
YOLOv8n	85.5	81.1	86.2	62.8	5.73
YOLOv8-EMA-CARAFE-Layer	86.9	83.4	91.0	67.5	5.95

附图2直观反映改进后的YOLOv8-EMA-CARAFE-Layer模型与原始YOLOv8n模型在训练过程中的性能差异，改进后的模型在训练过程中损失值下降更快，且整体曲线更加平滑，最终的损失值低于原始YOLOv8n模型，表明改进后的模型在训练过程中收敛性和稳定性得到了优化，表明改进后的模型在绿豆叶片病害检测任务中具有较高的实用性和性能优势。

2.2　引入不同注意力机制性能分析

为评估本文提出的EMA注意力机制的性能表现，将EMA注意力机制模块与卷积注意力模块CBAM（convolutional block attention module）、坐标注意力模块CA（coordinate attention）引入YOLOv8n模型中进行对比分析，结果如表3所示。

表3　添加不同注意力机制的模型对比试验

Table 3　Experimental comparison of models with different attention mechanisms

模型 Model	精确度 Precision(%)	召回率 Recall(%)	mAP@50(%)	mAP@50-95(%)	参数量 Params（MB）
YOLOv8_CBAM	84.5	78.6	86.8	64.3	5.86
YOLOv8_CA	87.4	80.3	86.7	64.0	5.75
YOLOv8_EMA	83.1	81.2	87.4	64.0	5.73

相较于YOLOv8_CBAM和YOLOv8_CA模型，YOLOv8_EMA召回率分别提升了2.6%和0.9%，平均精度指标mAP@50分别增加了0.6%和0.7%。在精确度方面，EMA虽然低于CA和CBAM注意力机制，但本研究考虑在绿豆叶片病害检测的农业应用场景中，小目标病斑占比高，漏检会导致病害扩散和产量损失，代价远高于误检，因此优先提升召回率以减少漏检更具实际意义，mAP@50作为综合评价指标EMA最高，EMA参数量最低，仅为5.73 MB，表明EMA可同步提升检测性能和控制模型复杂度，其综合性能更适配绿豆叶片病害检测。

2.3　消融实验

以YOLOv8n为基线，通过消融实验验证各改进模块有效性。由表4可知，单独引入EMA（试验1），mAP@50提升至87.4%、mAP@50-95提升1.2%，但精确度下降2.4%，这与特征调整引发的预测偏差有关。对于叠加CARAFE（试验2），其mAP@50进一步提升至87.9%，但mAP@50-95降至63.8%，参数

量增加0.27 MB，表明CARAFE可增强特征表达但泛化能力待优化。而在完整模型（试验3）中，精确度、召回率、mAP@50、mAP@50-95较基线分别提升1.4%、2.3%、4.8%、4.7%，参数量仅增加0.22 MB，说明小目标检测层可优化模型结构，并可兼顾轻量化与检测性能。

表4 YOLOv8n不同消融方法试验表现

Table 4 Performance of different ablation methods for YOLOv8n

消融试验组 Ablation study group	EMA	CARAFE	Layer	精确度 Precision(%)	召回率 Recall(%)	mAP@50(%)	mAP@50-95(%)	参数量 Params (MB)
0	–	–	–	85.5	81.1	86.2	62.8	5.73
1	√	–	–	83.1	81.2	87.4	64.0	5.73
2	√	√	–	87.2	80.5	87.9	63.8	6.00
3	√	√	√	86.9	83.4	91.0	67.5	5.95

为直观反映不同改进模块组合对模型性能的影响差异，将4类消融实验模型在训练过程中的性能变化进行对比分析。由附图3可知，改进模块越多，mAP@50提升越显著，改进后完整模型损失值始终最低，表明随迭代轮次增加，模型均逐渐收敛，进一步验证了改进方法的有效性。

2.4 与经典模型对比实验

为验证该研究算法相比当前热门目标检测模型的优越性，本文将改进模型与YOLOv3、YOLOv5、YOLOv6、YOLOv8n、YOLOv11系列模型进行对比，结果如表5所示。改进模型mAP@50达到了91.0%，较其他模型分别提升6.8%、0.3%、13.5%、4.8%、1.6%；mAP@50-95较YOLOv3、YOLOv6、YOLOv8n分别提升10.8%、11.2%、4.7%；且改进模型的其他参数整体表现优于其他对比模型，表现为精确度86.9%，召回率83.4%，参数量为5.95 MB。本研究改进后的模型在参数量方面虽略有增加，但仍保持在轻量化水平，具备实际应用于农业场景的良好基础。虽然mAP@50-95仅较YOLOv11提升1.6%，但这并不代表本文方法性能不及参数占优的YOLOv11，反而体现了面向特定病害检测场景的针对性改进在性能均衡与实际应用中的价值。此外，为全面评估模型的轻量化性能，本研究进一步测试了计算量和推理速度。改进模型虽FLOPs和推理延迟略有增加，但FPS仍高达357，远高于实时应用需求，结合低参数量特性，充分满足无人机、智能农机等移动终端的部署要求。综上，该模型在有效控制计算资源需求的同时，在绿豆叶片病害检测任务中实现了更优的综合性能表现。

表5 改进模型与传统目标检测模型的表现

Table 5 Performance comparison between the improved model and classical models

模型 Model	精确度 Precision(%)	召回率 Recall(%)	mAP@50(%)	mAP@50-95(%)	参数量 Params(MB)	FLOPs(G)	推理延迟 Latency(ms)	FPS
Yolov3	82.5	76.8	84.2	56.7	16.55	65.9	15.2	65.8
Yolov5	84.7	85.3	90.7	66.1	13.38	32.5	6.8	147.1
Yolov6	76.2	72.7	77.5	56.3	8.07	18.4	4.9	204.1
Yolov8n	85.5	81.1	86.2	62.8	5.73	8.7	2.1	476.2
Yolov11	88.7	81.5	89.4	65.6	4.93	7.2	1.8	555.6
YOLOv8-EMA-CARAFE-Layer	86.9	83.4	91.0	67.5	5.95	12.4	2.8	357.1

2.5 病害检测效果可视化分析

为进一步验证改进模型YOLOv8-EMA-CARAFE-Layer在绿豆叶片病害实际检测中的效果，本文对比分析了改进模型与YOLOv8模型在检测绿豆各类病害时的精度表现，检测结果如图7所示。由图可看出，相比YOLOv8模型，改进后的模型（YOLOv8-

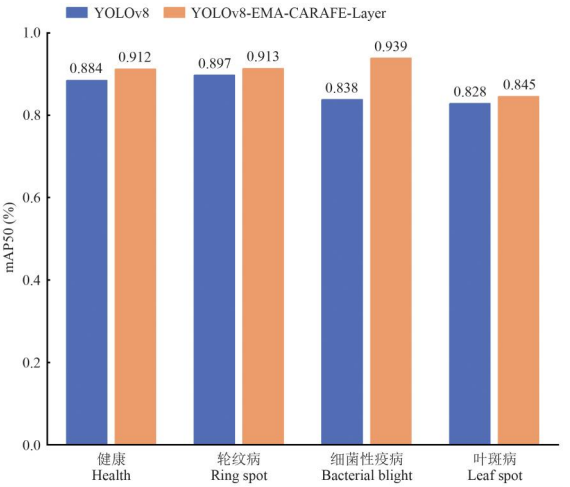


图7　对比分析YOLOv8和改进模型对绿豆各类病害检测精度

Fig. 7　Comparison of mung bean disease detection accuracy between YOLOv8 model and its improved model (YOLOv8-EMA-CARAFE-Layer)

EMA-CARAFE-Layer）对健康叶片、轮纹病、细菌性疫病、叶斑病的mAP@50分别提升2.8%、1.6%、10.1%、1.7%，尤其在细菌性疫病、叶斑病两类病害的检测中，表现优势显著。尽管数据集存在轮纹病样本较少的问题，但改进模型对轮纹病的mAP@50仍提升1.6%，可视化结果也显示其检测框精度更高、背景干扰抵抗更强，表明所采用的数据增强和训练平衡策略有效缓解了不平衡影响，对少数类型的识别效果未受显著负面影响。

进一步对两类模型绿豆各类病害进行可视化分析和验证，结果如图8所示。对于健康叶片，其检测边界更贴合叶片实际形态，有效减少了对背景区域的误判；针对细菌性疫病，该模型能够全面覆盖细小且密集分布的病斑区域，避免了原始模型易出现的漏检问题；在轮纹病检测中，改进模型的检测框选精度更高，可有效抵御背景干扰，精准定位病斑范围；而在叶斑病检测任务中，其能够完整捕捉密集分布的小叶斑目标，解决了原始模型对密集小目标识别不完整的缺陷。针对细菌性疫病，该模型能够全面覆盖细小且密集分布的病斑区域，总体上改善了原始模型的漏检问题，但在图8所示案例中仍出现过检与定位框不准确的情况。细菌性疫病的病斑具有边缘模糊、密集细小的特点，导致模型在特征提取时难以区分病斑与相似背景。EMA模块虽能抑制多数背景噪声，却可能对大范围模糊区域过度关注，影响CARAFE上采样核的稳定重建；同时，小目标检测层在提升召回时对模糊伪目标的抑制仍显不足。该结果表明，模型在极端模糊场景下存在局限，整体改进虽有效，仍需在特征区分与伪目标抑制方面进一步优化。综上所述，改进后的YOLOv8-EMA-CARAFE-Layer模型在多数绿豆叶片病害检测场景中表现优于原始YOLOv8n模型，具备良好的总体应用潜力。同时，上述失败案例分析也为模型在模糊边界条件下的后续优化提供了具体方向。

3　讨论

本研究针对绿豆病害传统检测方法效率低、复杂背景干扰大、小目标病害捕捉能力弱等问题，以

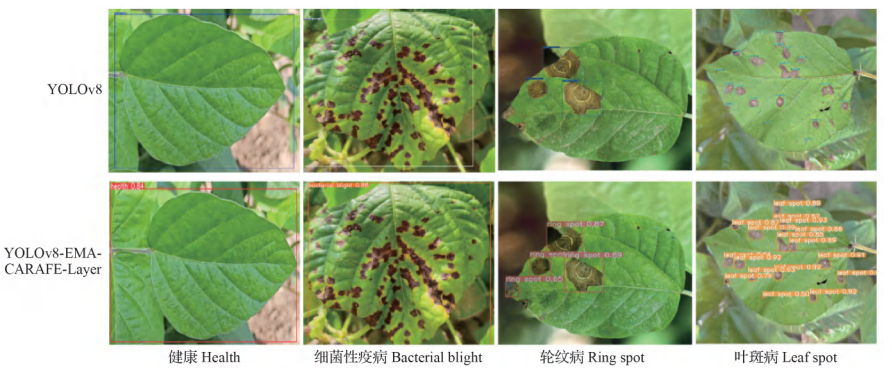


图8　对比分析YOLOv8和改进模型对绿豆各类病害检测可视化表现

Fig. 8　Comparison of visualization performance for mung bean disease detection between YOLOv8 and its improved model (YOLOv8-EMA-CARAFE-Layer)

YOLOv8n为基础架构，通过融入EMA高效多尺度注意力机制、CARAFE采样模块及新增小目标检测层，构建了YOLOv8-EMA-CARAFE-Layer改进模型，实现复杂自然环境下的精准快速检测。本文在针对3 927张图像的测试中，该改进模型精确度达86.9%、召回率83.4%、mAP@50 91.0%、mAP@50-95 67.5%，参数量仅5.95 MB，较基线YOLOv8n模型提升4.8%，且优于YOLOv3、YOLOv5等其他主流模型，这一提升主要源于三大核心模块的协同优化，其中EMA注意力机制通过跨空间学习与多尺度融合筛选关键病害特征，抑制复杂背景噪声，减少无效信息干扰，相较CBAM、CA等传统注意力机制，在低计算开销下显著降低漏检误检，尤其适配细菌性疫病、叶斑病等边缘模糊、受干扰严重的病害，与Deng等[28]验证的EMA复杂场景优势一致。其次，引入CARAFE上采样模块，通过动态生成内容感知上采样核，有效重建叶片病斑的模糊边界细节，相较于传统上采样方法及计算复杂度较高的BiFPN结构更具优势，弥补了传统插值的全局上下文感知不足的问题，Liu等[29]认为这可增强特征重建精度，从而将召回率提升至83.4%。最后，通过新增小目标检测层，结合上采样与特征融合技术，解决下采样语义信息丢失的问题，强化细小病斑感知，这与Liu等[26]提出的特征融合提升多尺度检测性能的研究逻辑相符。此外，相较于Khalid等[13]基于深度卷积神经网络的植物健康检测研究，本模型在轻量化前提下更适配绿豆叶片病害的细小、模糊、密集特点，实现了更高的泛化能力与检测精度。

EMA原为COCO等通用数据集设计，凭借高效多尺度校准与低开销提升检测性能。本研究中，其背景抑制作用在绿豆叶片病害复杂田间场景下更为突出，区别于通用任务的均衡关注。该差异反映了农业图像的独特挑战，使EMA表现出更强的针对性适应。作为高效轻量化模块，EMA为农业病害检测及田间设备部署提供了新的优化方向。

尽管该改进模型YOLOv8-EMA-CARAFE-Layer在包含田间复杂背景的现有混合数据集上取得了优异性能，但仍存在一定的局限性。第一，模型训练依赖高性能硬件，在资源受限移动设备部署时需进一步优化以降低推理延迟。第二，因EMA模块在简单场景会过度关注全局特征，易导致轻微预测偏差。第三，本研究目前仅涵盖细菌性疫病、叶斑病、轮纹病及健康叶片，虽然样本总量达3 927张并针对主要病害进行了优化，但病害类别有限，可能限制模型对其他病害、不同生育期症状变异及复合感染的泛化能力。第四，本研究所有图像均采集自自然田间环境，未划分简单背景和复杂背景子集进行针对性对比，也未充分覆盖极端光照、严重遮挡、病害严重度差异及极度杂乱背景等困难条件，因此对极端复杂场景的鲁棒性仍需进一步验证。第五，在细菌性疫病等边缘模糊类别中，个别案例仍存在过检与定位偏差，表明模型对极端模糊边界的区分能力有待提升。第六，本研究聚焦于绿豆叶片主要病害的识别与定位，尚未涉及病害严重程度的量化分级，这在实际农业或植物保护场景中往往具有更大的应用价值与实践指导意义。针对上述技术问题，未来研究可结合模型压缩与量化策略，推动模型在无人机、智能农机等移动设备的实时部署，同时，通过优化EMA模块注意力分配机制，平衡全局与局部特征关注程度，提升简单场景检测精确度[30]。此外，还需进一步扩展病害类别库，采集更多类型病害、复合感染样本以及不同生育期下的叶片图像，并构建更具挑战性的多环境测试集以及背景复杂度子集，通过对比实验量化模型在不同背景条件下的鲁棒性，提升数据集的环境多样性和模型在实际田间部署中的泛化能力，并重点开展病害严重程度量化分级研究，为绿豆病害的全面智能监测提供更强的支撑。综上所述，本文开发的YOLOv8-EMA-CARAFE-Layer改进模型可在复杂环境及绿豆叶片病害的高效精准检测条件下保持轻量化的特性，这对于未来应用于生产实践提供了一定的技术支撑。

4 结论

YOLOv8-EMA-CARAFE-Layer模型在保持轻量化的同时，实现了优异的病害检测精度。与原始YOLOv8n模型相比，改进模型的mAP@50和mAP@50-95分别提升至91.0%和67.5%，并在复杂背景与小目标病害检测中表现出更强的鲁棒性。此外，模型参数量仅为5.95 MB，具有良好的轻量化特性，能够满足无人机、智能农机等移动终端的部署需求，为田间绿豆病害的精准智能监测提供了可行的技术支撑。

文章所有附图附表请点击链接查看（https://bio-tech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260506103558_NewsFile_6.pdf）

参考文献

[1] 戴高星. 发展绿豆生产大有可为 [J]. 四川农业科技, 2011(6): 18-19.
Dai GX. Developing mung bean production is promising [J]. Sichuan Agric Sci Technol, 2011(6): 18-19.

[2] Maiti D, Majumdar M. Impact of bioprocessing on phenolic content and antioxidant activity of soy seed to improve hypoglycemic functionality [J]. Asian J Plant Sci Res, 2012, 2(2): 924-931.

[3] 孙瑞卿, 秦曙, 李晋栋, 等. 我国绿豆病虫害化学防治现状及质量安全问题分析 [J]. 农产品质量与安全, 2017(3): 91-94.
Sun RQ, Qin S, Li JD, et al. Current situation of chemical control of mung bean diseases and insect pests in China and analysis of quality and safety problems [J]. Qual Saf Agro Prod, 2017(3): 91-94.

[4] 赵玉梅. 农业信息化在蔬菜病虫害防治技术上的应用分析 [J]. 农业工程技术, 2022, 42(27): 31-32.
Zhao YM. Analysis on the application of agricultural informatization in vegetable pest control technology [J]. Agric Eng Technol, 2022, 42(27): 31-32.

[5] 梁斯佳, 李雷, 顾月, 等. 基于改进YOLO v8n的甘蔗叶片病害识别算法 [J]. 农业机械学报, 2025, 56(10): 567-574.
Liang SJ, Li L, Gu Y, et al. Sugarcane leaf disease recognition algorithm based on improved YOLO v8n [J]. Trans Chin Soc Agric Mach, 2025, 56(10): 567-574.

[6] Kumar Sahu S, Pandey M. An optimal hybrid multiclass SVM for plant leaf disease detection using spatial Fuzzy C-Means model [J]. Expert Syst Appl, 2023, 214: 118989.

[7] 黄林生, 江静, 黄文江, 等. Sentinel-2影像和BP神经网络结合的小麦条锈病监测方法 [J]. 农业工程学报, 2019, 35(17): 178-185.
Huang LS, Jiang J, Huang WJ, et al. Wheat yellow rust monitoring method based on Sentinel-2 image and BPNN model [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2019, 35(17): 178-185.

[8] 朱锐, 张家瑜, 黄继超, 等. 基于卷积神经网络的农作物叶片病害检测研究进展 [J]. 农业工程学报, 2025, 41(17): 15-28.
Zhu R, Zhang JY, Huang JC, et al. Research progress of crop leaf disease detection based on convolutional neural network [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2025, 41(17): 15-28.

[9] 徐洪丽, 安凤, 史宇轩. 基于改进YOLO v8的苹果叶片病害检测研究 [J]. 农业机械学报, 2025, 56(10): 530-538.
Xu HL, An F, Shi YX. Apple leaf disease detection method based on improved YOLO v8 [J]. Trans Chin Soc Agric Mach, 2025, 56(10): 530-538.

[10] 苗荣慧, 李志伟, 武锦龙. 基于改进YOLO v7的轻量化樱桃番茄成熟度检测方法 [J]. 农业机械学报, 2023, 54(10): 225-233.
Miao RH, Li ZW, Wu JL. Lightweight maturity detection of cherry tomato based on improved YOLO v7 [J]. Trans Chin Soc Agric Mach, 2023, 54(10): 225-233.

[11] 郑俊键, 兰玉彬, 熊万杰, 等. 基于YOLOv5s改进模型的小白菜虫害识别方法 [J]. 农业工程学报, 2024, 40(13): 124-133.
Zheng JJ, Lan YB, Xiong WJ, et al. Method for identification of Pak choi pests and diseases based on improved YOLOv5s [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2024, 40(13): 124-133.

[12] 祝诗平, 张越, 唐茂杰, 等. 基于改进YOLO v10n的百香果成熟果实检测方法 [J]. 农业机械学报, 2025, 56(10): 549-557, 595.
Zhu SP, Zhang Y, Tang MJ, et al. Ripe fruit detection model of passion fruit based on improved YOLO v10n [J]. Trans Chin Soc Agric Mach, 2025, 56(10): 549-557, 595.

[13] Khalid M, Sarfraz M, Iqbal U, et al. Real-time plant health detection using deep convolutional neural networks [J]. Agriculture, 2023, 13(2): 510.

[14] 公徐路, 张淑娟. 基于改进YOLOv5s的苹果叶片小目标病害轻量化检测方法 [J]. 农业工程学报, 2023, 39(19): 175-184.
Gong XL, Zhang SJ. Lightweight detection of small target diseases in apple leaf using improved YOLOv5s [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2023, 39(19): 175-184.

[15] 袁杰, 谢霖伟, 郭旭, 等. 基于改进YOLOv7的苹果叶片病害检测方法 [J]. 农业机械学报, 2024, 55(11): 68-74.
Yuan J, Xie LW, Guo X, et al. Apple leaf disease detection method based on improved YOLOv7 [J]. Trans Chin Soc Agric Mach, 2024, 55(11): 68-74.

[16] 毛锐, 张宇晨, 王泽玺, 等. 利用改进Faster-RCNN识别小麦条锈病和黄矮病 [J]. 农业工程学报, 2022, 38(17): 176-185.
Mao R, Zhang YC, Wang ZX, et al. Recognizing stripe rust and yellow dwarf of wheat using improved Faster-RCNN [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2022, 38(17): 176-185.

[17] 王会征, 孙良晨, 李新龙, 等. 基于改进YOLOv7-tiny的番茄叶片病虫害检测方法 [J]. 农业工程学报, 2024, 40(10): 194-202.
Wang HZ, Sun LC, Li XL, et al. Detecting tomato leaf pests and diseases using improved YOLOv7-tiny [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2024, 40(10): 194-202.

[18] 甘雨, 郭庆文, 王春桃, 等. 基于改进EfficientNet模型的作物害虫识别 [J]. 农业工程学报, 2022, 38(1): 203-211.
Gan Y, Guo QW, Wang CT, et al. Recognizing crop pests using an improved EfficientNet model [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2022, 38(1): 203-211.

[19] 刘诗怡, 胡滨, 赵春. 基于改进YOLOv7的黄瓜叶片病虫害检测与识别 [J]. 农业工程学报, 2023, 39(15): 163-171.
Liu SY, Hu B, Zhao C. Detection and identification of cucumber leaf diseases based improved YOLOv7 [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2023, 39(15): 163-171.

[20] 孙丰刚, 王云露, 兰鹏, 等. 基于改进YOLOv5s和迁移学习的苹果果实病害识别方法 [J]. 农业工程学报, 2022, 38(11): 171-179.
Sun FG, Wang YL, Lan P, et al. Identification of apple fruit diseases using improved YOLOv5s and transfer learning [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2022, 38(11): 171-179.

[21] Arnal Barbedo JG. Plant disease identification from individual lesions and spots using deep learning [J]. Biosyst Eng, 2019, 180: 96-107.

[22] 罗志聪, 何陈涛, 陈登捷, 等. 基于轻量化YOLOv8s-GD的自然环境下百香果快速检测模型 [J]. 农业机械学报, 2024, 55(8): 291-300.
Luo ZC, He CT, Chen DJ, et al. Passion fruit rapid detection model based on lightweight YOLOv8s-GD [J]. Trans Chin Soc Agric Mach, 2024, 55(8): 291-300.

[23] 李嘉诚, 陈中举, 许浩然. 基于改进YOLOv8n的真实场景下草莓病害检测方法 [J]. 中国农机化学报, 2024, 45(12): 267-274.
Li JC, Chen ZJ, Xu HR. A method for strawberry disease detection in real scenarios based on improved YOLOv8n [J]. J Chin Agric Mech, 2024, 45(12): 267-274.

[24] Zhang YP, Liu J, Li SZ, et al. ESM-YOLOv11: a lightweight deep learning framework for real-time peanut leaf spot disease detection and precision severity quantification in field conditions [J]. Comput Electron Agric, 2025, 238: 110801.

[25] Chen SY, Li YX, Zhang YD, et al. Soft X-ray image recognition and classification of maize seed cracks based on image enhancement and optimized YOLOv8 model [J]. Comput Electron Agric, 2024, 216: 108475.

[26] Liu S, Qi L, Qin HF, et al. Path aggregation network for instance segmentation [C]//2018 IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. June 18-23, 2018, Salt Lake City, UT, USA. Piscataway, NJ: IEEE, 2018: 8759-8768.

[27] 于营, 王春平, 付强, 等. 语义分割评价指标和评价方法综述 [J]. 计算机工程与应用, 2023, 59(6): 57-69.
Yu Y, Wang CP, Fu Q, et al. Survey of evaluation metrics and methods for semantic segmentation [J]. Comput Eng Appl, 2023, 59 (6): 57-69.

[28] Deng H, Chen YY, Xu YL. ALD-YOLO: a lightweight attention detection model for apple leaf diseases [J]. Front Plant Sci, 2025, 16: 1616224.

[29] Liu F, Wang SD, Pang SC, et al. Detection and recognition of tea buds by integrating deep learning and image-processing algorithm [J]. Food Measure, 2024, 18(4): 2744-2761.

[30] 杨锋, 姚晓通. 基于改进YOLOv8的小麦叶片病虫害检测轻量化模型 [J]. 智慧农业, 2024, 6(1): 147-157.
Yang F, Yao XT. Lightweighted wheat leaf diseases and pests detection model based on improved YOLOv8 [J]. Smart Agric, 2024, 6(1): 147-157.

（责任编辑　张婷婷）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):293-304

功能膜覆盖下羊粪堆肥促腐效果及碳氮素转化的微生物机制

李荣荣[1] 蔡瑞[2*]
（1.渭南师范学院环境与生命科学学院，渭南 714000；2.华中科技大学环境科学与工程学院，武汉 430074）

摘 要： 【目的】探讨功能膜覆盖好氧堆肥技术对青藏高原羊粪堆肥碳素和氮素的生物转化影响。【方法】设置功能膜覆盖处理组（FM）和空白对照组（CK），在青藏高原进行为期30 d的堆肥发酵，测定堆肥过程木质纤维素、腐殖酸、铵态氮、硝态氮和亚硝态氮等碳和氮素组分的变化，利用宏基因组学技术分析碳和氮素转化的功能基因和微生物，揭示功能膜覆盖对羊粪堆肥碳和氮素生物转化的影响机制。【结果】FM可促进堆肥升温和延长高温期，并显著提升堆肥产品种子发芽指数达14.9%（P<0.05）；FM可显著降低堆肥产品中纤维素和半纤维素含量，降幅分别达8.77%和7.88%（P<0.05），并提升胡敏酸含量达20.0%（P<0.001）；FM有利于氮素保留，显著提升铵态氮、硝态氮和亚硝态氮含量，增幅分别为10.6%、20.0%和16.4%（P<0.05）。有机碳氧化是碳素生物转化的最主要途径，FM的有机碳氧化过程中与木质纤维素降解相关的功能基因丰度高于CK，促进了FM中木质纤维素的降解；而CK组的发酵和甲烷生成过程相关基因丰度高于FM。在氮素转化途径中，硝酸盐还原是堆肥初期最主要的氮素转化步骤，而亚硝酸盐氨化在后期占主导地位。FM的硝酸盐还原和亚硝酸盐氨化功能基因丰度在堆肥过程中高于CK，而亚硝酸盐还原、一氧化氮还原和氧化亚氮还原过程中则低于CK。【结论】覆盖功能膜可促进青藏高原羊粪堆肥腐熟，可通过强化微生物有机碳氧化作用促进木质纤维素降解和腐殖酸合成，还可通过抑制反硝化作用和促进亚硝酸盐氨化作用减少氮损失。

关键词： 膜覆盖好氧堆肥技术；羊粪；青藏高原；碳素转化；氮素转化；微生物作用机制
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-0969

Microbial Mechanisms of Promoting Humification and Carbon-Nitrogen Transformation of Sheep Manure Composting under Functional Membrane Covering

LI Rong-rong[1] CAI Rui[2*]
（1. *School of Environment and Life Sciences, Weinan Normal University, Weinan* 714000; 2. *School of Environmental Science and Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan* 430074）

Abstract: 【Objective】 This study aims to investigate the effects of membrane-covered aerobic composting technology on the biotransformation of carbon and nitrogen during sheep manure composting on the Qinghai-Tibet Plateau.【Method】 Two treatment groups were established: the functional membrane covering group (FM) and the blank control group (CK). Composting fermentation was conducted on the Qinghai-Tibet Plateau over a 30-day period. Changes in carbon and nitrogen components—including lignocellulose, humic acid, ammonium nitrogen, nitrate nitrogen, and nitrite nitrogen—were monitored throughout the process. Additionally, metagenomic analysis was employed to identify the functional genes and microbial communities involved in carbon and nitrogen transformation, thereby elucidating the mechanisms through which functional membrane covering influences biotransformation processes.【Result】 FM accelerated the composting heating phase, extended the duration of the thermophilic stage, and significantly improved the germination index of the final compost product by 14.9% (P< 0.05). FM significantly reduced the cellulose and hemicellulose contents in the compost by 8.77% and 7.88%, respectively (P<0.05), while

收稿日期：2025-09-10
基金项目：湖北省自然科学基金项目（2025AFB134），渭南师范学院青年人才项目（2024XJ-QNRC-05）
*通信作者：蔡瑞 cairui0104@163.com

increasing humic acid content by 20.0% (P<0.001). Furthermore, FM enhanced nitrogen retention, significantly increasing the contents of ammonium nitrogen, nitrate nitrogen, and nitrite nitrogen by 10.6%, 20.0%, and 16.4%, respectively (P<0.05). Organic carbon oxidation was identified as the dominant pathway for carbon transformation. Functional genes associated with lignocellulose degradation were more abundant in the FM group than in the CK group, which can enhance lignocellulose degradation under membrane covering. Conversely, genes involved in fermentation and methane production were more prevalent in CK. Regarding nitrogen transformation, nitrate reduction was the primary pathway during the early composting stage, while nitrite ammonification dominated in the later stage. The FM group exhibited higher abundances of genes involved in nitrate reduction and nitrite ammonification throughout the composting process compared to CK, whereas it showed lower abundances in the pathways of nitrite reduction, nitric oxide reduction, and nitrous oxide reduction. 【Conclusion】 The use of functional membrane can effectively promote the maturation of sheep manure compost on the Qinghai-Tibet Plateau, can enhance organic carbon oxidation, facilitate lignocellulose degradation and humic acid synthesis, and can reduce nitrogen loss by suppressing denitrification and promoting nitrite ammonification.

Keywords: membrane-covered aerobic composting technology; sheep manure; Qinghai-Tibet Plateau; carbon conversion; nitrogen conversion; microbial action mechanism

青藏高原作为我国主要的牧区之一，年羊存栏数超过2 000万头[1]。这些羊在集中圈养情况下，每年产生大量羊粪已成为病原体和药物残留的重要来源，对牧场周边空气、土壤和地下水造成污染[2]。合理处置和利用这些废弃物对青藏高原的生态建设和可持续发展具有现实意义。堆肥是实现羊粪资源化的有效途径。然而，青藏高原具有高海拔、寒冷和氧气稀薄等气候特色[3]，严重影响该地区的堆肥发酵。其中氧气稀薄的气候抑制了堆体中好氧微生物活性，造成升温慢和腐熟效率低[4]。因此，优化青藏高原羊粪堆肥发酵工艺，提高堆肥中氧气浓度和好氧微生物代谢活性具有重要意义。

近年来，功能膜覆盖好氧堆肥技术日益受到关注[5]。由于功能膜的屏障作用，堆肥反应器中的气体在相对密闭的空间内形成“微正压”环境[6]。这种“微正压”环境增加了氧气与物料的接触面积和时间，从而强化好氧微生物代谢产热[7]。功能膜覆盖好氧堆肥技术已被广泛证明在促进畜禽粪便、污泥和厨余垃圾等废弃物堆肥升温和腐熟上具有良好效果[8-10]，还具有减少氮素损失[6-7]和促进病原体及抗生素抗性去除[11-12]等优势。功能膜的优异性能，特别是其“微正压”特性带来的氧气环境可能在青藏高原等氧气稀薄地区畜禽粪便堆肥生产上具有潜在的应用前景。因此，可合理地推测功能膜覆盖好氧堆肥技术能有效促进青藏高原羊粪堆肥腐殖化进程，显著提升堆肥产品品质。然而，该技术在青藏高原畜禽粪便堆肥上的应用研究仍然十分缺乏。

值得注意的是，羊粪中富含木质纤维素等碳素组分和一定含量的氮组分[13]，这些组分的转化对堆肥进程和产品品质具有重要影响。微生物参与了堆肥过程中有机碳氧化、甲烷代谢、氨化、硝化、反硝化和厌氧氨氧化等重要的碳氮转化步骤[13-14]。在这些过程中，木质纤维素的降解和腐殖质的形成与堆肥质量密切相关[15]。此外，一些碳氮转化过程也会造成碳氮的损失和空气污染，例如甲烷代谢会导致碳损失，氨化和反硝化会导致氮损失[13]。功能膜覆盖好氧堆肥技术能显著调节堆肥系统氧气分布和利用情况，进而影响与氧气密切相关的碳素（甲烷代谢等）和氮素转化（反硝化和厌氧氨氧化等）过程。因此，探究功能膜覆盖好氧堆肥过程中碳氮转化规律及微生物作用机制，对调控堆肥进程和提高堆肥产品品质具有指导作用和重要意义。然而，目前有关功能膜覆盖好氧堆肥过程中，碳素和氮素转化的生物化学过程及微生物作用机制的研究鲜有报道。

基于此，本研究为探究功能膜覆盖好氧堆肥技术对青藏高原羊粪堆肥发酵的影响，通过测定堆肥过程碳素（有机碳、木质纤维素和腐殖酸）和氮素组分（铵态氮、硝态氮和亚硝态氮）的变化，研究功能膜覆盖对羊粪堆肥碳氮转化的影响。进一步通过宏基因组学技术分析碳和氮素转化的功能基因和微生物，探究堆肥过程碳和氮素转化的微生物机制，以期为青藏高原畜禽粪便高效利用提供理论和技术支撑。

1　材料与方法

1.1　材料

本研究以羊粪为主要堆肥原料，油菜秸秆为碳氮比和孔隙度调理剂。羊粪和油菜秸秆均取自于青海省巴卡台农牧场，其基本理化性质如附表1所示。

1.2　方法

1.2.1　堆肥及取样方法　将自然风干的羊粪和粉碎的油菜秸秆以干重比为3∶1的比例进行混合，混合物碳氮比为22∶1。调节混合物的含水率为60%左右。将40 kg混合物置于60 L的反应器（附图1）内进行堆肥实验，采用强制通风方式，通风速率为3 L/min，堆肥周期为30 d。堆肥地点位于青海省巴卡台农牧场（海拔约为3 300 m）。

试验共设置2个处理，一组覆盖功能膜（FM），一组不覆膜（空白对照，CK），每个处理组设置3个重复。功能膜为膨体聚四氟乙烯（expanded PTFE）材料，采购于苏州优可发新材料科技有限公司，其基本性能如附表2所示。第0、3、15和30天从堆体多处采集共500 g左右样品充分混合，然后分为两部分，一部分样品用于理化指标测定，另一部分用于宏基因组测序。

1.2.2　基本理化指标测定　温度、含水率、pH和电导率的测定参考蔡瑞等[16]的方法，具体为：每天9:00、16:00测量堆体温度，将温度计均匀插入堆体上、中、下层各5个地点，计算15个点的平均温度；使用鼓风干燥机（DHG-9123A型）在105 ℃下烘干样品至恒重，根据烘干前后质量差计算堆肥含水率；将新鲜堆肥样品用去离子水以固液比1∶10浸提3 h后过滤，分别用pH计（瑞士梅特勒-托利多S20型）和电导率仪（雷磁DDB-303A型）测定pH和电导率。将烘干样品置于550 ℃的马弗炉中燃烧5 h，根据前后重量差计算有机质含量[17]。取堆肥浸提液20 mL于9 cm的培养皿中，并垫上滤纸，向浸提液中添加20颗小白菜种子，于20 ℃的黑暗条件下培养48 h后测定种子发芽率和根长，参考Arias等[18]公式计算种子发芽指数。

1.2.3　碳和氮组分测定　总有机碳含量、胡敏酸和富里酸使用焦磷酸钠-氢氧化钠混合提取液（含0.1 mol/L焦磷酸钠和0.1 mol/L氢氧化钠）提取，并采用重铬酸钾容量法测定其含量（中华人民共和国农业行业标准，NY/T 1867-2010）。纤维素、半纤维素和木质素采用改良的范氏洗涤法测定[19]。总氮采用凯氏定氮法测定（KDY-9830型凯氏定氮仪）；样品铵态氮、硝态氮和亚硝态氮含量参考Guo等[20]的方法测定。

1.2.4　宏基因组测序及分析　使用PowerSoil DNA Isolation Kit（MoBio Laboratories, Carlsbad, CA）试剂盒提取样品基因组DNA。用1%琼脂糖凝胶检测基因组DNA的纯度和质量。采用Covaris S220将基因组DNA打断成300 bp左右的小片段，并将打断产物进行纯化。取一定量纯化的DNA打断产物加入10 μL End repair & Add A进行末端修复加A尾，再加入33.5 μL Adaptor Ligation Mix连接含有Index的测序接头。使用2%琼脂糖凝胶对文库片段进行筛选，切取400–450 bp片段的胶块并进行纯化。加入Index和接头引物、酶及Mix进行PCR富集完成文库构建。构建完成的Hiseq文库使用磁珠法进行纯化。使用Nanodrop初步检测文库浓度，Agilent 2100检测文库片段，qPCR精确定量文库浓度。最后将不同文库按照有效浓度及目标数据量的需求混合后，在Illumina Hiseq平台上机测序。构建与碳氮循环相关的标记基因集，从多个权威数据库（包括KEGG、KOFAM、Pfam和TIGRfam）中收集数据，基于这些数据库中检索到的功能注释，使用Transcripts Per Million（TPM）方法分析功能组成以评估功能丰度[21]。通过整合微生物功能关联和相应的功能基因信息，对参与碳氮循环的微生物类群进行鉴定和分析。

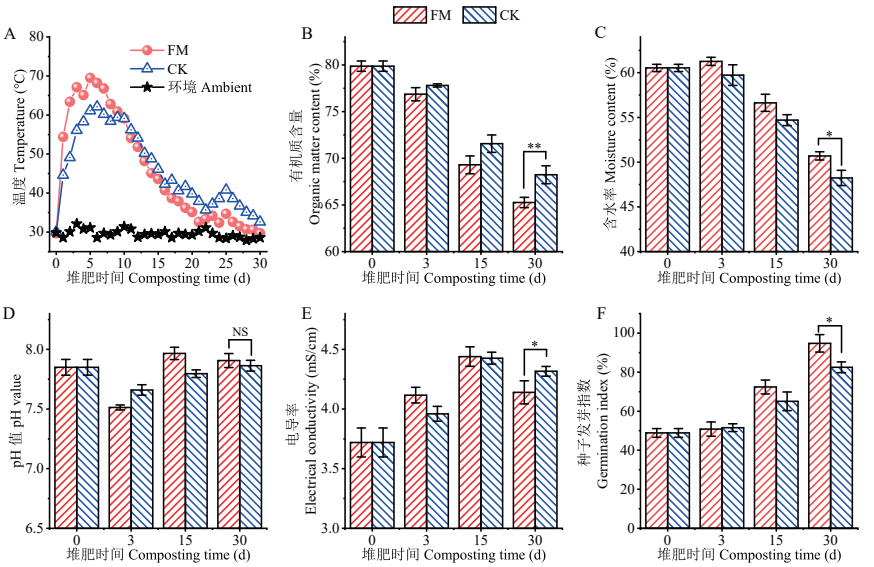
1.2.5　数据统计与分析　采用SPSS 26.0软件计算各指标平均值和标准差，并进行独立样本t检验。采用Origin 2021软件制图。

2　结果

2.1　堆肥基本理化指标的变化

如图1-A所示，2组堆肥温度在初期快速上升，其中FM在堆肥第1–12天的温度均超过50 ℃，并于第5天达到最高温度69.5 ℃。CK在堆肥第3–13天的温度均超过50 ℃，于第6天达到最高温度62.1 ℃。在堆肥中后期，堆肥温度开始快速下降，并逐渐接近环境温度。CK组在堆肥第11天后的温度高于FM组。如图1-B所示，2组堆肥的有机质含量在堆肥过程中持续下降，堆肥结束时，FM和CK的有机质含

量分别为65.3%和68.2%，呈现显著性差异（$P<0.01$）。2组堆肥含水率在堆肥前3 d保持在60%左右（图1-C），随后，2组堆肥的含水率呈现下降趋势。堆肥结束时，FM和CK的含水率分别为50.7%和48.2%，呈现显著性差异（$P<0.05$）。如图1-D–E所示，2组堆肥的pH值在堆肥前3 d呈现下降趋势，随后上升后保持稳定，而电导率则在堆肥前半段持续上升后逐渐下降。堆肥结束时，FM和CK的pH值分别为7.91和7.86，无显著性差异（$P>0.05$）；而电导率分别为4.14和4.32 mS/cm，具有显著性差异（$P<0.05$）。如图1-F所示，2组堆肥的种子发芽指数在堆肥初期保持在50%左右，随后快速上升。堆肥结束时，FM和CK的种子发芽指数分别为94.8%和82.5%，具有显著性差异（$P<0.05$）。



*$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$, NS: $P>0.05$, the same below

图1 堆肥过程基本理化指标的变化

Fig. 1 Changes in basic physical and chemical indicators during the composting process

2.2 堆肥碳组分的变化

如图2-A–C所示，2组堆肥总有机碳、纤维素和半纤维素含量在整个堆肥过程均呈现下降趋势，其中FM的下降速度快于CK。堆肥结束时，FM和CK的总有机碳含量分别为375.1和394.3 mg/g，纤维素含量分别为224.7和246.3 mg/g，半纤维素含量分别为135.7和147.3 mg/g。FM组在堆肥结束时总有机碳、纤维素和半纤维素含量均显著低于CK组（$P<0.05$）。与纤维素和半纤维素含量变化趋势相反，2组堆肥的木质素含量在堆肥过程呈现缓慢上升趋势（图2-D）。堆肥结束时，FM和CK的木质素含量分别为146.3和147.3 mg/g，无显著性差异（$P>0.05$）。如图2-E所示，2组堆肥的胡敏酸含量在堆肥过程呈现上升趋势。FM组的胡敏酸含量上升速率在堆肥过程快于CK组，其含量在堆肥结束时显著高于CK组（$P<0.001$）。如图2-F所示，2组堆肥的富里酸含量在堆肥过程先呈现上升趋势后逐渐下降。堆肥结束时，FM和CK的富里酸含量分别为50.5和55.1 mg/g，呈现显著性差异（$P<0.05$）。

2.3 堆肥氮组分的变化

如图3-A所示，2组堆肥总氮含量在堆肥前3 d维持在21.5 mg/g左右。随后，2组的堆肥总氮含量呈现上升趋势，其中FM组的总氮含量上升速度快于CK组。堆肥结束时，FM的总氮含量显著高于CK组（$P<0.05$）。如图3-B和3-C所示，2组堆肥的NH_4^+-N和NO_3^--N含量在堆肥前半段均呈现上升趋势。随后，2组堆肥的NH_4^+-N含量呈现下降趋势，而NO_3^--N含量则持续上升。堆肥结束时，FM和CK的NH_4^+-N含量分别为1 549和1 401 mg/kg，NO_3^--N含量分别为1 332和1 110 mg/kg，均呈现显著差异（$P<0.05$）。如图3-D

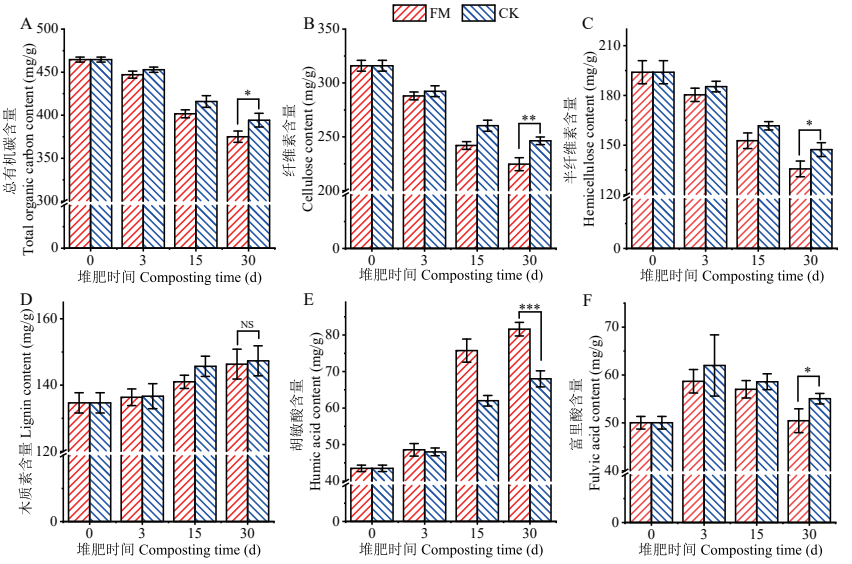


图2　堆肥过程碳组分的变化

Fig. 2　Changes in carbon composition during the composting process

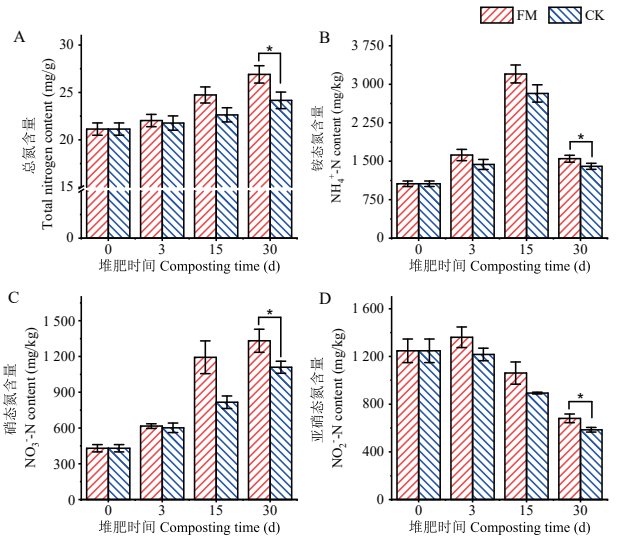


图3　堆肥过程氮组分的变化

Fig. 3　Changes in nitrogen components during the composting process

所示，2组堆肥的NO_2^--N含量在堆肥前3 d保持在1 200 mg/kg以上。随后，2组堆肥的NO_2^--N含量呈现下降趋势，其中FM组下降至681 mg/kg，CK组下降至585.3 mg/kg，2组NO_2^--N含量差异显著（P<0.05）。

2.4　碳和氮素转化功能基因的变化

如图4-A所示，共49个功能基因与有机碳氧化相关，其中*acyl-CoA dehydrogenase*丰度显著高于其他有机碳氧化功能基因，其次为*beta-glucosidase*、*hexosaminidase*、*beta-galactosidase*、*branched-chain amino acid aminotransferase/4-amino-4-deoxychorismate lyase*、*histidinol-phosphate/aromatic aminotransferase*、*phosphoserine aminotransferase*和*ornithine/acetylornithine aminotransferase*等。随着堆肥进行，大部分有机碳氧化功能基因丰度呈现快速上升趋势，而在堆肥中后期，这些功能基因丰度逐渐下降后保持稳定。另外，少数有机碳氧化功能基因丰度在堆肥过程先呈现下降趋势后逐渐上升，例如*beta-xylosidase*、*aspartate/tyrosine/aromatic aminotransferase*和*arabinosidase*等。本研究共7个功能基因涉及到发酵过程（图4-B），其中*ack*、*acs*和*pta*丰度相对较高，并且呈现出不同的变化趋势。如图4-C所示，共3个功能基因与甲烷营养过程相关，其中*mmoB*丰度显著高于其他2个基因，并且该基因丰度在堆肥过程先上升后逐渐下降。如图4-D所示，共3个基因涉及甲烷生成过程，但这3个功能基因均表现出较低丰度。图4-E显示了4个碳转化过程功能基因总丰度的变化。在这4个碳转化过程中，有机碳氧化过程丰度显著高于其他3个过程，该过程总丰度在堆肥初期呈现快速上升趋势，随后逐渐下降。甲烷营养和甲

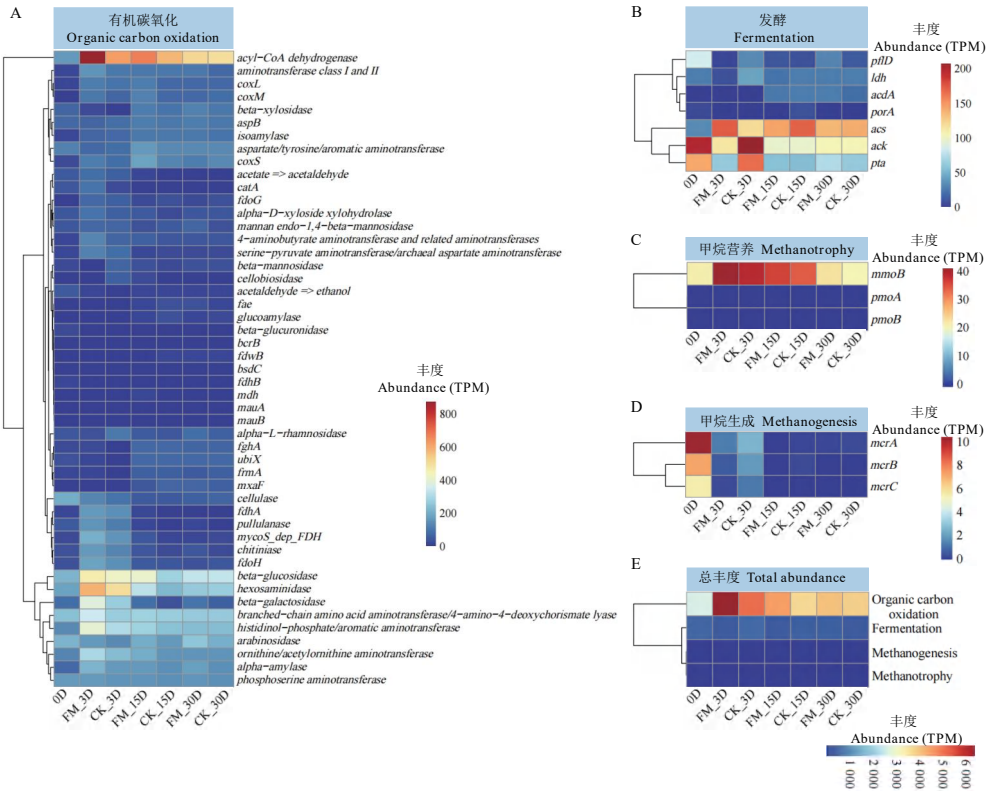


图4 碳素转化功能基因丰度的变化

Fig. 4 Changes in the abundance of function genes of carbon conversion

烷生成功能基因丰度显著低于其他过程，其中甲烷营养丰度先上升后下降，而甲烷生成则持续下降。在2个处理组中，FM组的有机碳氧化功能基因丰度在整个堆肥过程均高于CK组，而FM组的发酵和甲烷生成过程功能基因丰度在堆肥前15 d低于CK组。

如图5-A所示，共4个基因涉及到硝酸盐还原过程，其中*narG*和*narH*的丰度高于*napA*和*napB*，并且*narG*和*narH*的丰度在堆肥初期快速上升，随后快速下降。FM组的narG和*narH*的丰度高于CK组。*nirS*和*nirK*参与亚硝酸盐还原过程（图5-B），其中*nirK*的丰度显著高于*nirS*，且其丰度在堆肥前15 d快速上升，随后保持在较高丰度。如图5-C所示，共2个基因涉及到一氧化氮还原过程，其中*norB*的丰度高于*norC*，并且*norB*的丰度在堆肥过程呈现快速上升后保持稳定。*nosZ*参与了氧化亚氮还原过程（图5-D），该基因丰度在堆肥初期保持较低水平，随后快速上升，但仍显著低于其他氮素转化步骤的功能基因丰度。如图5-E所示，共4个基因涉及到亚硝酸盐氨化过程，其中*nirD*丰度最高。4个亚硝酸盐氨化功能基因在堆肥过程均呈现上升趋势。图5-F显示了5个氮转化过程功能基因总丰度的变化。在堆肥初期，硝酸盐还原功能基因总丰度显著高于其他4个氮转化步骤。随后，硝酸盐还原功能基因总丰度逐渐下降，而其他4个步骤丰度则逐渐上升，其中亚硝酸盐氨化功能基因丰度高于其他步骤。在5个氮素转化过程中，FM组的硝酸盐还原和亚硝酸盐氨化功能基因丰度在堆肥过程中高于CK组，而亚硝酸盐还原、一氧化氮还原和氧化亚氮还原过程中则低于CK组。

2.5 碳和氮素转化功能微生物的变化

图6显示了碳素转化4个关键步骤功能微生物（属水平）的贡献度变化。如图6-A所示，棒杆菌属（*Corynebacterium*）是堆肥原料中有机碳氧化步骤最主要功能微生物，其贡献度为69.2%，其次为短杆菌属（*Brevibacterium*）（14.8%）和小短杆菌属（*Brachybacterium*）（11.9%）。随后3 d，棒杆菌属

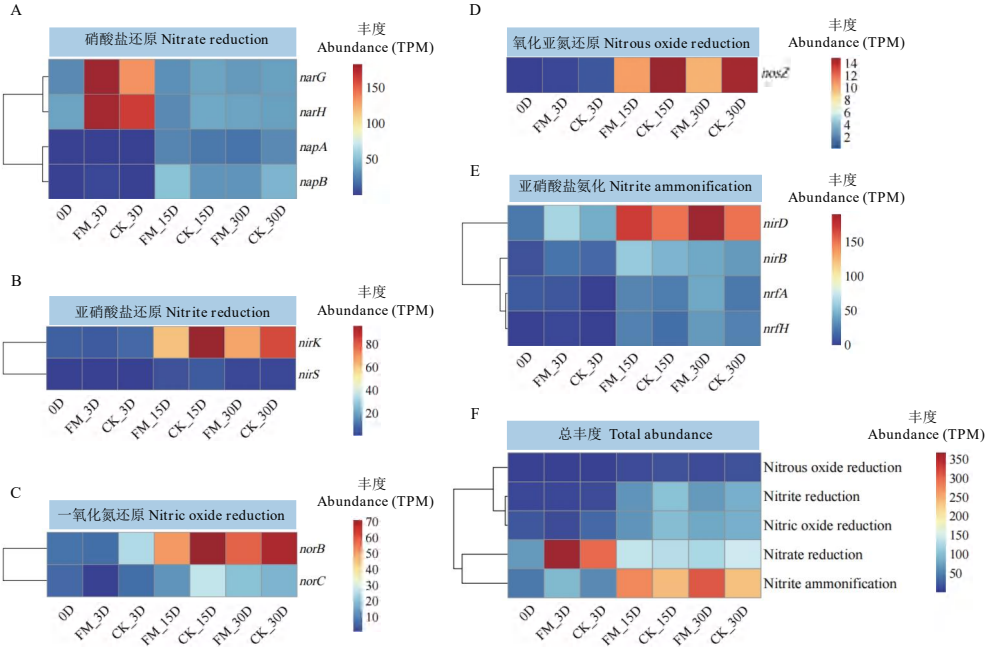


图5　氮素转化功能基因丰度的变化

Fig. 5　Changes in the abundance of function genes of nitrogen transformation

（*Corynebacterium*）、短杆菌属（*Brevibacterium*）和小短杆菌属（*Brachybacterium*）仍为有机碳氧化的主要参与者，其中棒杆菌属（*Corynebacterium*）和短杆菌属（*Brevibacterium*）贡献度呈现下降趋势，而小短杆菌属（*Brachybacterium*）则逐渐上升。另外，拟诺卡氏菌属（*Nocardiopsis*）也是堆肥第3天有机碳氧化的主要功能微生物。堆肥第15天和第30天，藤黄单胞菌属（*Luteimonas*）、链霉菌属（*Streptomyces*）、假黄单胞菌属（*Pseudoxanthomonas*）、裂孢菌属（*Thermobifida*）和纤维单胞菌属（*Cellulomonas*）成为有机碳氧化的主要功能微生物。如图6-B所示，咸海鲜球菌属（*Jeotgalicoccus*）、棒杆菌属（*Corynebacterium*）和阎氏菌属（*Yaniella*）是堆肥原料中发酵过程最主要功能微生物，其总贡献度大于93%。经过3 d堆肥发酵，咸海鲜球菌属（*Jeotgalicoccus*）和棒杆菌属（*Corynebacterium*）的贡献度快速下降，而小短杆菌属（*Brachybacterium*）和拟诺卡氏菌属（*Nocardiopsis*）成为主要贡献者。堆肥第15天和第30天，藤黄单胞菌属（*Luteimonas*）、假黄单胞菌属（*Pseudoxanthomonas*）、圣格奥尔根菌属（*Georgenia*）和细小微杆菌属（*Microbacterium*）成为发酵步骤的最主要功能微生物。如图6-C所示，甲烷短杆菌属（*Methanobrevibacter*）和甲烷粒菌属（*Methanocorpusculum*）为原料中甲烷生成步骤的唯二功能微生物。在堆肥第3天开始，甲烷短杆菌属（*Methanobrevibacter*）则成为该步骤的唯一功能微生物。假面神菌属（*Janibacter*）是堆肥原料中甲烷营养过程最主要功能微生物（图6-D），其次为游动球菌属（*Planococcus*）和短杆菌属（*Brevibacterium*），其贡献度分别为67.5%、21.6%和10.9%。随后3 d，这3种细菌属仍是甲烷营养过程最主要功能微生物。另外，硫胺素芽胞杆菌属（*Aneurinibacillus*）的贡献度快速上升。堆肥第15天和第30天，高温单孢菌属（*Thermomonospora*）、假诺卡菌属（*Pseudonocardia*）、散生杆菌属（*Patulibacter*）和假单胞菌属（*Pseudomonas*）等微生物成为甲烷营养过程的主要参与者。

图7显示了氮素转化4个关键步骤（硝酸盐还原、亚硝酸盐还原、一氧化氮还原和亚硝酸盐氨化）功能微生物的贡献度变化。如图7-A所示，棒杆菌属（*Corynebacterium*）是堆肥原料中硝酸盐还原过程最主要的功能微生物，其贡献度高达68.1%。另外，迪茨氏菌属（*Dietzia*）、短杆菌属（*Brevibacterium*）

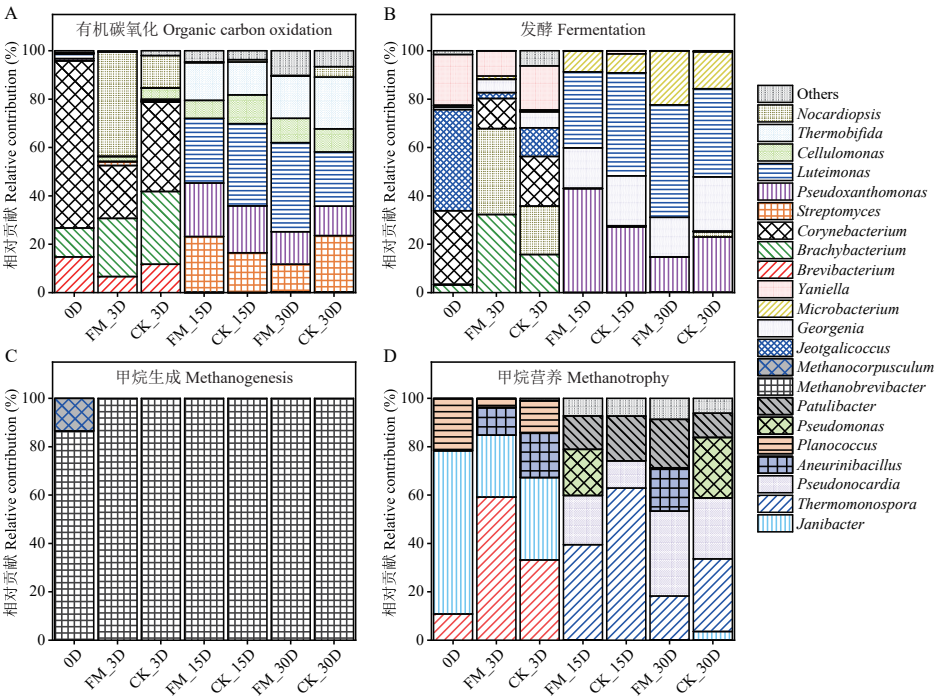


图6 碳转化功能微生物贡献度的变化

Fig. 6 Changes in the contribution of functional microorganisms of carbon conversion

和小短杆菌属（*Brachybacterium*）的贡献度也超过了5%。接下来的3 d，棒杆菌属（*Corynebacterium*）和迪茨氏菌属（*Dietzia*）贡献度快速下降，而拟诺卡氏菌属（*Nocardiopsis*）和小短杆菌属（*Brachybacterium*）则快速上升。堆肥中后期，藤黄单胞菌属（*Luteimonas*）成为最主要参与者，其贡献度保持在37.0%–69.1%，其次为链霉菌属（*Streptomyces*）和纤维单胞菌属（*Cellulomonas*）。如图7-B所示，假单胞菌属（*Pseudomonas*）（89.5%）和藤黄单胞菌属（*Luteimonas*）（10.5%）是原料中亚硝酸盐还原的参与者。堆肥第3天，假单胞菌属（*Pseudomonas*）（78.6%）仍然是CK中亚硝酸盐还原的主要参与者，该菌在FM中贡献度为20.3%。另外，假根瘤菌属（*Pseudorhizobium*）在FM和CK中的贡献度分别为75.2%和15.2%。堆肥第15天和30天，藤黄单胞菌属（*Luteimonas*）也成为亚硝酸盐还原的最主要参与者，其贡献度超过42%。另外，根瘤菌属（*Rhizobium*）、水微菌属（*Aquamicrobium*）、硝酸盐还原菌属（*Nitratireductor*）和迪茨氏菌属（*Dietzia*）也是亚硝酸盐还原的主要参与者。如图7-C所示，假单胞菌属（*Pseudomonas*）（75.7%）和藤黄单胞菌属（*Luteimonas*）（22.3%）是原料中一氧化氮还原过程的最主要参与者。随后，藤黄单胞菌属（*Luteimonas*）的贡献度上升至36%以上，假单胞菌属（*Pseudomonas*）下降至34%以下。另外，直丝菌属（*Planifilum*）在FM和CK中的贡献度分别上升至39.4%和17.5%。堆肥第15天和30天，溶杆菌属（*Lysobacter*）、类固醇杆菌属（*Steroidobacter*）、假黄单胞菌属（*Pseudoxanthomonas*）、盐水水黏细菌（*Enhygromyxa*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）和直丝菌属（*Planifilum*）是该步骤的主要参与者。如图7-D所示，假黄单胞菌属（*Pseudoxanthomonas*）、交替红色杆菌属（*Altererythrobacter*）和假单胞菌属（*Pseudomonas*）是原料中亚硝酸盐氨化的最主要功能微生物，其次为纤维微菌属（*Cellulosimicrobium*）和迪茨氏菌属（*Dietzia*）。堆肥第3天，拟诺卡氏菌属（*Nocardiopsis*）和纤维单胞菌属（*Cellulomonas*）分别成为FM和CK中亚硝酸盐氨化的最主要参与者，贡献度均大于75%。堆肥第15天和30天，交替红色杆菌属（*Altererythrobacter*）、链霉菌属（*Streptomyces*）、

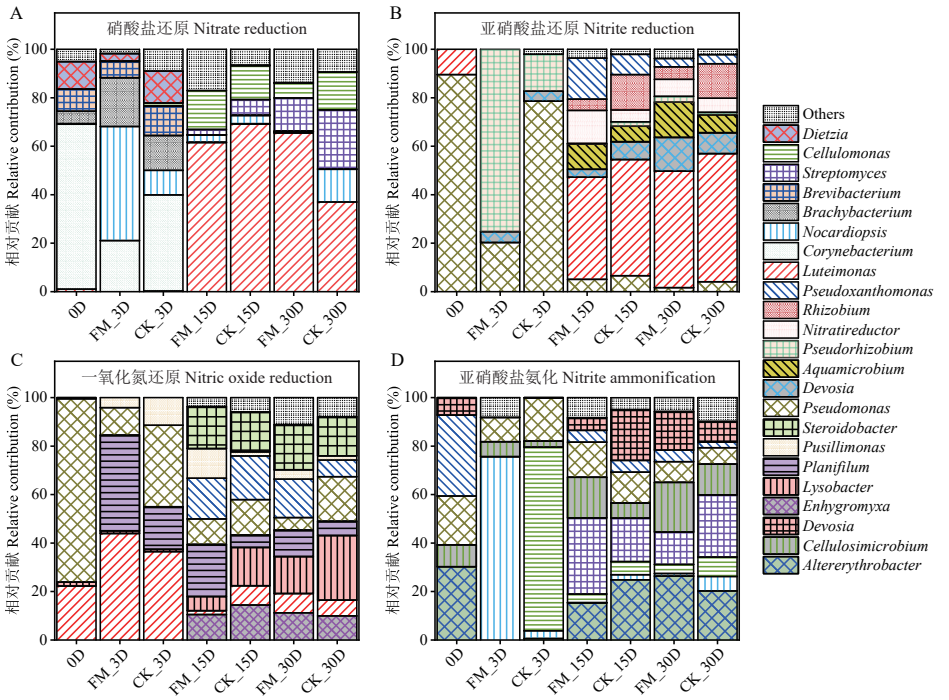


图7　氮转化功能微生物贡献度的变化

Fig. 7　Changes in the contribution of functional microorganisms of nitrogen conversion

纤维微菌属（*Cellulosimicrobium*）、迪茨氏菌属（*Dietzia*）和假单胞菌属（*Pseudomonas*）成为该步骤的主要功能微生物。

3　讨论

3.1　堆肥理化性质的变化

FM组在堆肥初期的温度明显高于CK组，表明覆盖功能膜可显著提升堆肥温度。这主要是因为功能膜覆盖带来的“微正压”环境提升了堆体内氧气浓度和分布均匀性，增强了好氧微生物的呼吸代谢活性，进而促进有机质降解而产热[22]。氧浓度的升高是好氧微生物（如纤维素降解菌）大量增殖的关键前提。由于功能膜的阻碍作用，FM组的含水率在堆肥过程均高于CK组，这与前期的研究相似[6]。堆肥初期，堆肥pH值呈现下降趋势，这主要是由于有机质分解产生大量有机酸所致[23]。另外，有机质降解也会产生大量小分子代谢物和释放盐离子，这导致电导率在堆肥前期呈上升趋势，造成种子发芽指数偏低[24]。随着小分子有毒成分降解和盐离子钝化，电导率逐渐下降，种子发芽指数则逐渐上升。堆肥结束时，FM和CK的种子发芽率均大于80%，均达到腐熟水平[25]。FM的种子发芽指数显著高于CK，表明覆盖功能膜可显著提升堆肥成熟度。

3.2　碳转化及机制

木质纤维素的降解对堆肥效率和腐殖质的形成具有重大影响[26-27]。纤维素和半纤维素的降解为木质纤维素降解菌提供能量，中间产物也为其他微生物提供代谢底物[13]。值得注意的是，木质素含量呈现上升趋势，主要是因为木质素具有强大抗降解能力，随着其他有机质大量降解，木质素含量因“浓缩效应”而呈上升趋势[16, 28]。FM的纤维素和半纤维素含量均显著低于CK，这与FM较高的氧浓度密切相关：充足的氧气促进了木质纤维素降解菌的代谢活性，加速了复杂碳源分解。胡敏酸含量在前15 d快速上升，这与堆肥有机质降解产生的中间代谢物通过一系列缩合反应密切相关[29]。堆肥结束时，FM的胡敏酸含量显著高于CK，这可能是因为FM中有机质降解比CK更强烈，且在较高氧浓度下，微生物将更多的碳中间体转化为胡敏酸前体。

富里酸含量在后期持续下降，是因为富里酸结构简单，易被微生物降解[30]。此外，富里酸降解产物还可促进胡敏酸合成[31]。

在有机碳氧化的功能基因中，*acyl-CoA dehydrogenase*丰度高于其他基因，说明*acyl-CoA dehydrogenase*在有机碳氧化中发挥重要作用[13]。此外，*beta-galactosidase*、*beta-glucosidase*、*branched-chain amino acid aminotransferase/4-amino-4-deoxychorismate lyase*、*alpha-amylase*和*hexosaminidase*，*histidinol-phosphate/aromatic aminotransferase*等基因也具有较高丰度，这将有效促进木质纤维素等有机物降解。FM的这些功能基因高于CK，与FM中更高的氧浓度刺激好氧微生物分泌胞外酶有关。发酵（fermentation）过程的功能基因也具有较高丰度，说明这一步骤也是主要的碳转化途径。早期阶段，参与有机碳氧化的微生物主要是棒杆菌属（*Corynebacterium*）、拟诺卡氏菌属（*Nocardiopsis*）、短杆菌属（*Brevibacterium*）和小短杆菌属（*Brachybacterium*）。以往的研究报道，棒杆菌属（*Corynebacterium*）与有机质降解密切相关[13]，拟诺卡氏菌属（*Nocardiopsis*）对羧甲基纤维素、微晶纤维素和木聚糖具有良好的水解活性[32]，短杆菌属（*Brevibacterium*）和小短杆菌属（*Brachybacterium*）能分泌脂肪酶[33]。堆肥后期，参与有机碳氧化的微生物主要为藤黄单胞菌属（*Luteimonas*）、假黄单胞菌属（*Pseudoxanthomonas*）、链霉菌属（*Streptomyces*）、小微杆菌属（*Microbacterium*）和纤维单胞菌属（*Cellulomonas*），说明这些微生物更容易在成熟堆肥促进有机质转化合成。

3.3 氮转化及机制

在堆肥过程，FM的总氮含量均高于CK，这主要是因为功能膜阻碍了部分含氮气体排放，导致部分含氮气体在膜上冷凝并回流至堆体[22]。另外，FM的“微正压”环境提高了堆体内氧气浓度，抑制了反硝化菌活性，从而减少氮素损失。堆肥前期，NH_4^+-N含量快速增加，这是因为氨化作用导致大量NH_4^+-N产生[13]。随着氨化作用减弱和NH_4^+-N转化为氨气，NH_4^+-N含量逐渐下降。FM的NH_4^+-N含量在堆肥过程中高于CK，这可能是因为FM的氨化作用强度高于CK。随着堆肥进行，NO_3^--N含量呈现上升趋势，这可能是因为中后期硝化作用更强烈[34]。

硝酸盐还原过程在早期强于其他步骤，说明该步骤是早期最重要的氮转化步骤。在这一步骤中，NO_3^--N会转化为NO_2^--N[35]，这可能是早期NO_3^--N含量较低的原因之一。在中后期，亚硝酸盐氨化、亚硝酸盐还原、一氧化氮还原和氧化亚氮还原强度上升。在这些步骤中，亚硝酸盐氨化将促进NO_2^--N向NH_4^+-N的转化[21]。亚硝酸盐还原、一氧化氮还原和氧化亚氮还原是反硝化步骤，这3个步骤会导致氮素以NO、N_2O和N_2的形式损失，硝酸盐异化成氨也会造成N_2O排放[36]。反硝化作用通常在低氧或厌氧条件下被诱导，因此氧浓度是调控这些过程的关键环境因子。上述结果与以往有关羊粪和猪粪堆肥氮损失的研究具有相似之处，这些研究发现反硝化作用功能基因丰度越高，堆肥氮素损失越严重[13, 37]。在堆肥过程，CK的反硝化作用强于FM，归因于CK中厌氧区较多，为反硝化微生物提供了适宜的微环境。另外，FM的亚硝酸盐氨化作用强于CK，可能与较高氧浓度下某些兼性微生物的代谢偏好改变有关，这在一定程度上抑制了反硝化作用，促进堆肥NH_4^+-N生成。早期参与反硝化的微生物主要为棒杆菌属（*Corynebacterium*）、拟诺卡氏菌属（*Nocardiopsis*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）、假根瘤菌属（*Pseudorhizobium*）、藤黄单胞菌属（*Luteimonas*）、直丝菌属（*Planifilum*）和鞘氨醇杆菌属（*Sphingobacterium*），后期主要为藤黄单胞菌属（*Luteimonas*）和直丝菌属（*Planifilum*）。这些功能微生物也在前期研究中得到了证实[38-40]。值得注意的是，藤黄单胞菌属（*Luteimonas*）、*Corynebacterium*、短杆菌属（*Brevibacterium*）、小短杆菌属（*Brachybacterium*）和假单胞菌属（*Pseudomonas*）同时参与了碳和氮转化过程，表明这些微生物具备多种元素循环的代谢潜力。

4 结论

覆盖功能膜可提升青藏高原羊粪堆肥腐殖化效率，促进堆肥升温，显著提高堆肥产品成熟度。覆盖功能膜可通过强化微生物群落的有机碳氧化过程来促进羊粪堆肥木质纤维素降解和胡敏酸合成，还能通过抑制反硝化作用和强化亚硝酸盐氨化作用来减少氮素损失。

文章所有附图附表请点击链接查看（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260507102354_NewsFile_7.pdf）

参考文献

[1] Cai R, Cui XY, Cao XH, et al. Crushing combined with high-frequency turning can promote material degradation of sheep manure compost on the Qinghai-Tibet Plateau by improving the microbial metabolic function [J]. J Environ Chem Eng, 2023, 11(2): 109535.

[2] 李荣荣, 蔡瑞. 添加油菜秸秆对青藏高原羊粪堆肥病原菌及抗生素去除效果的影响 [J]. 中国土壤与肥料, 2024(11): 214-221.
Li RR, Cai R. Effects of rape straw addition on pathogenic bacteria and antibiotic removal efficiency of sheep manure compost on the Qinghai-Tibet Plateau [J]. Soil Fertil Sci China, 2024(11): 214-221.

[3] Guo N, Wu QF, Shi FY, et al. Seasonal dynamics of diet-gut microbiota interaction in adaptation of yaks to life at high altitude [J]. npj Biofilms Microbiomes, 2021, 7: 38.

[4] Cai R, Xu Q, Luo X, et al. Influence of turning frequency on removal of pathogens and antibiotic resistance genes from full-size sheep manure composting on the Qinghai-Tibet Plateau [J]. Biochem Eng J, 2025, 222: 109845.

[5] Xiong JP, Su Y, Qu HW, et al. Effects of micro-positive pressure environment on nitrogen conservation and humification enhancement during functional membrane-covered aerobic composting [J]. Sci Total Environ, 2023, 864: 161065.

[6] Fang C, Qu HW, Yang SW, et al. Micro-positive pressure significantly decreases greenhouse gas emissions by regulating archaeal community during industrial-scale dairy manure composting [J]. J Environ Manag, 2024, 360: 121163.

[7] Xiong JP, Su Y, He XQ, et al. Effects of functional membrane coverings on carbon and nitrogen evolution during aerobic composting: Insight into the succession of bacterial and fungal communities [J]. Bioresour Technol, 2023, 369: 128463.

[8] 徐文倩. 奶牛粪覆膜堆肥过程碳氮气体排放影响及调控机制研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2024.
Xu WQ. Study on the characteristics of carbon and nitrogen gas emissions and regulation mechanism of dairy manure membrane-covered composting process [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2024.

[9] Cui P, Bai YD, Li X, et al. Enhanced removal of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements during sewage sludge composting covered with a semi-permeable membrane [J]. J Hazard Mater, 2020, 396: 122738.

[10] Li YC, Liu YD, Yong XY, et al. Odor emission and microbial community succession during biogas residue composting covered with a molecular membrane [J]. Bioresour Technol, 2020, 297: 122518.

[11] González I, Robledo-Mahón T, Silva-Castro GA, et al. Evolution of the composting process with semi-permeable film technology at industrial scale [J]. J Clean Prod, 2016, 115: 245-254.

[12] Robledo-Mahón T, Silva-Castro GA, Kuhar U, et al. Effect of composting under semipermeable film on the sewage sludge virome [J]. Microb Ecol, 2019, 78(4): 895-903.

[13] Cai R, Zuo SS, Cao XH, et al. Carbon and nitrogen transformation mechanism and functional microorganisms of sheep manure composting on the Qinghai-Tibet Plateau under different moisture content [J]. J Environ Chem Eng, 2023, 11(6): 111341.

[14] Li X, Wang AC, Wan WJ, et al. High salinity inhibits soil bacterial community mediating nitrogen cycling [J]. Appl Environ Microbiol, 2021, 87(21): e01366-e01321.

[15] Li G, Zhu QH, Niu QQ, et al. The degradation of organic matter coupled with the functional characteristics of microbial community during composting with different surfactants [J]. Bioresour Technol, 2021, 321: 124446.

[16] 蔡瑞, 张帅, 崔欣雨, 等. 添加高温期堆料对青藏高原羊粪堆肥有机成分降解及酶活性的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(7): 2831-2841.
Cai R, Zhang S, Cui XY, et al. Effect of adding high temperature period compost on degradation of organic components and enzyme activity of sheep manure composting on Qinghai Tibet Plateau [J]. China Anim Husb Vet Med, 2022, 49(7): 2831-2841.

[17] 蔡瑞, 张帅, 郑猛虎, 等. 复合菌剂对青藏高原羊粪堆肥腐熟的影响 [J]. 家畜生态学报, 2023, 44(6): 71-78.
Cai R, Zhang S, Zheng MH, et al. Effects of compound microorganisms on maturity of sheep manure composting on Qinghai-Tibet plateau [J]. J Domest Anim Ecol, 2023, 44(6): 71-78.

[18] Arias O, Viña S, Uzal M, et al. Composting of pig manure and forest green waste amended with industrial sludge [J]. Sci Total Environ, 2017, 586: 1228-1236.

[19] Zeng ZT, Guo XY, Xu P, et al. Responses of microbial carbon metabolism and function diversity induced by complex fungal enzymes in lignocellulosic waste composting [J]. Sci Total Environ, 2018, 643: 539-547.

[20] Guo R, Li GX, Jiang T, et al. Effect of aeration rate, C/N ratio and moisture content on the stability and maturity of compost [J]. Bioresour Technol, 2012, 112: 171-178.

[21] Zhou ZC, Tran PQ, Breister AM, et al. METABOLIC: high-throughput profiling of microbial genomes for functional traits, metabolism, biogeochemistry, and community-scale functional networks [J]. Microbiome, 2022, 10: 33.

[22] Ma SS, Fang C, Sun XX, et al. Bacterial community succession during pig manure and wheat straw aerobic composting covered

with a semi-permeable membrane under slight positive pressure [J]. Bioresour Technol, 2018, 259: 221-227.

[23] Cai R, Zhang S, Cui XY, et al. Reasonable water replenishment strategies can improve the fermentation efficiency and bacterial community of sheep manure composting on the Qinghai-Tibet Plateau [J]. J Mater Cycles Waste Manag, 2023, 25(2): 1204-1215.

[24] Barje F, El Fels L, El Hajjouji H, et al. Biodegradation of organic compounds during co-composting of olive oil mill waste and municipal solid waste with added rock phosphate [J]. Environ Technol, 2013, 34(21): 2965-2975.

[25] Unuofin FO, Mnkeni PNS. Optimization of *Eisenia fetida* stocking density for the bioconversion of rock phosphate enriched cow dung-waste paper mixtures [J]. Waste Manag, 2014, 34(11): 2000-2006.

[26] Cai YY, He YH, He K, et al. Degradation mechanism of lignocellulose in dairy cattle manure with the addition of calcium oxide and superphosphate [J]. Environ Sci Pollut Res, 2019, 26 (32): 33683-33693.

[27] Wei YQ, Zhao Y, Xi BD, et al. Changes in phosphorus fractions during organic wastes composting from different sources [J]. Bioresour Technol, 2015, 189: 349-356.

[28] Xu JQ, Jiang ZW, Li MQ, et al. A compost-derived thermophilic microbial consortium enhances the humification process and alters the microbial diversity during composting [J]. J Environ Manag, 2019, 243: 240-249.

[29] Tang YF, Dong B, Dai XH. Hyperthermophilic pretreatment composting to produce high quality sludge compost with superior humification degree and nitrogen retention [J]. Chem Eng J, 2022, 429: 132247.

[30] Zhou Y, Selvam A, Wong JWC. Evaluation of humic substances during co-composting of food waste, sawdust and Chinese medicinal herbal residues [J]. Bioresour Technol, 2014, 168: 229-234.

[31] Gao X, Zhang J, Liu GL, et al. Enhancing the transformation of carbon and nitrogen organics to humus in composting: Biotic and abiotic synergy mediated by mineral material [J]. Bioresour Technol, 2024, 393: 130126.

[32] Saratale GD, Oh SE. Production of thermotolerant and alkalotolerant cellulolytic enzymes by isolated *Nocardiopsis* sp. KNU [J]. Biodegradation, 2011, 22(5): 905-919.

[33] Ozturkoglu-Budak S, Wiebenga A, Bron PA, et al. Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese [J]. Int J Food Microbiol, 2016, 237: 17-27.

[34] Yu HY, Xie BT, Khan R, et al. The changes in carbon, nitrogen components and humic substances during organic-inorganic aerobic co-composting [J]. Bioresour Technol, 2019, 271: 228-235.

[35] Giri NC, Wedasingha L, Manicke N, et al. Reversible interconversion of nitrate and nitrite catalyzed by periplasmic nitrate reductase from *Campylobacter jejuni* [J]. J Am Chem Soc, 2025, 147(16): 13243-13250.

[36] Lycus P, Soriano-Laguna MJ, Kjos M, et al. A bet-hedging strategy for denitrifying bacteria curtails their release of N_2O [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(46): 11820-11825.

[37] Jiang JS, Wang Y, Guo FQ, et al. Composting pig manure and sawdust with urease inhibitor: succession of nitrogen functional genes and bacterial community [J]. Environ Sci Pollut Res, 2020, 27(29): 36160-36171.

[38] Zhang X, Li SZ, Cheng WT, et al. Oxytetracycline stress reconstruct the core microbial community related to nitrogen transformation during composting [J]. Bioresour Technol, 2021, 319: 124142.

[39] Lei LS, Gu J, Wang XJ, et al. Effects of phosphogypsum and medical stone on nitrogen transformation, nitrogen functional genes, and bacterial community during aerobic composting [J]. Sci Total Environ, 2021, 753: 141746.

[40] Zhong XZ, Zeng Y, Wang SP, et al. Insight into the microbiology of nitrogen cycle in the dairy manure composting process revealed by combining high-throughput sequencing and quantitative PCR [J]. Bioresour Technol, 2020, 301: 122760.

(责任编辑 张婷婷)

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):305-316

动态调控小热休克蛋白表达以提升大肠杆菌耐热性并高效生产L-乳酸

梁浩[1] 黄恩园[1] 朱丽雯[1] 赵锦芳[1, 2] 刘晓楠[1, 2, 3, 4] 王永泽[1, 2*]
（1.湖北工业大学生命科学与健康工程学院,武汉 430068; 2.湖北工业大学发酵工程教育部重点实验室,武汉 430068; 3.广西科学院,南宁 530007; 4.非粮生物质能技术全国重点实验室,南宁 530007）

摘 要： 【目的】增强工业微生物的耐热性可一定程度缩短发酵时间、减少杂菌污染及促进产物的溶解，拟通过小热休克蛋白的筛选及动态表达提高大肠杆菌的耐热性。【方法】对不同种属的小热休克蛋白在大肠杆菌BL21(DE3)中进行表达和筛选，筛选得到的小热休克蛋白进一步使用不同强度的组成型启动子及温敏启动子P_L驱动表达，研究小热休克蛋白表达对大肠杆菌耐热性的影响。【结果】来自腾冲热厌氧杆菌*Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4的小热休克蛋白（sHsp）能提高大肠杆菌在高温环境下的耐热性，蛋白质序列比对进一步验证了蛋白β3片层序列Pro-Gly片段的重要作用。不同强度组成型启动子驱动小热休克蛋白来提高宿主在45 ℃发酵性能，结果表明强启动子P_{M193}条件下L-乳酸的产量最高但生物量较低。温敏性启动子P_L被进一步选用驱动sHsp的动态表达，通过种子阶段低温培养减少sHsp的表达，减少种子阶段的生长负荷以期提高生物量。最终L-乳酸产量可达到30±0.58 g/L，最大生物量（OD_{600}）达到8.1±0.32，比P_{M193}组成型启动子表达的乳酸产量和生物量（OD_{600}）分别提高6%和17%。【结论】动态调控小热休克蛋白表达可以提高大肠杆菌在高温条件下L-乳酸发酵效果，可作为一种提高工业微生物耐热性的有效手段。

关键词： 大肠杆菌；小热休克蛋白；动态调控；L-乳酸；高温发酵
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0179

Enhancing *E. coli* Thermotolerance via Dynamic Control of Small Heat Shock Protein Expression for Efficient L-lactate Production

LIANG Hao[1] HUANG En-yuan[1] ZHU Li-wen[1] ZHAO Jin-Fang[1, 2] LIU Xiao-nan[1, 2, 3, 4] WANG Yong-ze[1, 2*]
（1. *School of Life and Health Sciences, Hubei University of Technology, Wuhan* 430068; 2. *Key Laboratory of Fermentation Engineering, Ministry of Education, Hubei University of Technology, Wuhan* 430068; 3. *Guangxi Academy of Sciences, Nanning* 530007; 4. *State Key Laboratory of Non-Food Biomass Energy Technology, Nanning* 530007）

Abstract: 【Objective】 Enhanced thermotolerance of industrial microorganisms shortens fermentation time, reduces microbial contamination, and promotes product solubility. This study aimed to enhance thermotolerance of *Escherichia coli* (*E. coli*) by screening and dynamic expression of small heat shock proteins (sHsps). 【Method】 Small heat shock proteins from diverse species were expressed and screened in *E. coli* BL21(DE3). The selected sHsp was further expressed under the control of constitutive promoters with different strengths and the thermosensitive promoter P_L, and the effect of sHsp expression on *E. coli* thermotolerance was examined. 【Result】 The sHsp from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 enhanced thermotolerance of *E. coli* under high-temperature conditions. Protein sequence alignment verified that the Pro-Gly segment in the β3 sheet of this protein played an important role. Constitutive promoters with different strengths were used to drive sHsp expression to improve host fermentation performance at 45 ℃. The results showed that the strong promoter P_{M193} gave the highest L-lactic acid titer but relatively low biomass. The thermosensitive promoter P_L was further used to drive dynamic sHsp expression. Low-temperature seed culture reduced sHsp expression and relieved growth burden in the seed stage, thereby increasing biomass. The final L-lactic

收稿日期：2026-02-05
基金项目：“尖锋”行动计划（广西重大专项计划）（桂科JF2504850012），教育部工业发酵省部共建协同创新中心2023年开放基金（4303-00149）
*通信作者：王永泽 wangyongze@hbut.edu.cn

acid titer reached 30±0.58 g/L, and the maximum biomass (OD_{600}) reached 8.1±0.32, which were 6% and 17% higher than those under the P_{M193} constitutive promoter, respectively. 【Conclusion】 Dynamically regulated expression of heat shock proteins (sHsp) can enhance the L-lactic acid fermentation performance of *E. coli* under high-temperature conditions, and this approach can serve as an effective strategy to improve the thermal tolerance of industrial microorganisms.

Keywords: *Escherichia coli*; small heat shock protein; dynamic regulation; L-lactic acid; high-temperature fermentation

提升发酵菌株的耐热性，将为工业发酵带来诸多优势[1]：（1）高温发酵适合全年发酵，而低温发酵时温控成本大幅攀升；（2）在适宜高温区间内，耐热菌株的细胞代谢速率与酶促反应效率提升，能够有效缩短发酵周期，提高单位时间内目标产物的合成量，直接提升生产效率；（3）较高的发酵温度可减少中、低温环境下杂菌污染的概率，显著提升发酵过程的稳定性与产品合格率。（4）提升发酵温度通常有助于增加溶解度，防止产物在胞内结晶，从而提高产量。

虽然高温发酵有诸多优点，但是许多微生物并不耐受高温，除部分嗜热芽胞杆菌之外，如大肠杆菌和酵母等工业微生物生长温度都是37 ℃或更低的温度[2]，导致这些微生物不能在高温下进行发酵。如何提高工业微生物的耐热性已成为高温发酵的瓶颈问题，通过高温驯化技术[3]或者通过基因工程的方法对胞外多糖[4]、细胞膜[5]及小热休克蛋白[6]的筛选或改造都大大提高了微生物的耐热性。

作为热休克蛋白家族的独特亚家族，小热休克蛋白（small heat shock proteins, sHsps）是唯一完全不依赖ATP即可发挥分子伴侣功能的小热休克蛋白，具有超快速应激响应特性，还能高效抵御多种非生物胁迫，覆盖范围远超其他热休克家族[7]。小热休克蛋白表达能有效提高大肠杆菌的耐热性能，目前已有很多种类的小热休克蛋白被筛选用来提高大肠杆菌的热稳定性，但小热休克蛋白的筛选还存在诸多问题，一方面一些小热休克蛋白的表达仅仅限于大肠杆菌常见的表达宿主BL21(DE3)中[8]，对常见的大肠杆菌工程菌株，如大肠杆菌W、MG1655和C等菌株的耐热性提升报道较少。另外一方面，一些小热休克蛋白，如嗜热栖热菌（*Thermus thermophilus*）的热休克蛋白因高疏水结构在中温宿主中易形成包涵体，在大肠杆菌中可溶性表达比例不足10%[9]，其表达条件也可能影响大肠杆菌耐热性或抗逆性；此外，对于工业微生物来说，要尽量减少诱导剂的使用，但组成型启动热休克蛋白往往会对大肠杆菌生长带来一定影响，如组成型表达极端嗜盐菌的小热休克蛋白发现，小热休克蛋白表达会对大肠杆菌细胞施加显著的代谢负担[10]。

本文基于前人对小热休克蛋白的筛选研究[1, 8, 11-12]，进一步对小热休克蛋白进行筛选，探讨这些热休克蛋白表达水平对大肠杆菌耐热性的影响，此外为解决小热休克蛋白表达和细胞生长之间的矛盾，采用热诱导启动子介导小热休克蛋白动态表达的方式来平衡大肠杆菌生长和小热休克蛋白表达。本研究旨在获得一株高耐热性的工程菌株，并为提高工业微生物的耐热性提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 菌株 *Escherichia coli* HBUT-LL（*E. coli*W Δ*frd*BC Δ*adh*E Δ*pta* Δ*pfl*B Δ*ald*A Δ*csc*R Δ*ldh*A::*ldh*L）为实验室构建并保存[13]、Trelief® 5α超级感受态细胞（DLC114）购自北京擎科生物科技股份有限公司；蛋白表达宿主*E. coli* BL21(DE3)为实验室保存；深海海洋栖热菌（*Oceanithermus profundus*，简写为OP）[8]、腾冲热厌氧杆菌MB4（*Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4，简写为TT）[12]、葡萄酒酒球菌（*Oenococcus oeni*，简写为OO）[1]、烈火球菌（*Pyrococcus furiosus*，简写为PF）[11]的小热休克蛋白（sHsp）对应核酸序列均于九天基因科技（天津）有限公司合成，通过*Nco* I和*Hin*d III双酶切后连接在载体pET28a中，合成载体分别命名为pET-28a-OP、pET-28a-TT、pET-28a-OO和pET-28a-PF。人工组成型启动子P_{M193}、P_{M146}及P_{M137}均化学合成于九天生物科技（天津）有限公司并构建在载体pET-28a-P_{M193}-*tkt*和pET-28a-*kan*^{r}-P_{M146}-*idi*-P_{M137}上。无缝克隆基因编辑所有质粒（见文献[14]），pSIM6质粒提供P_L启动子[15]，pEcgRNA质粒提供*ccd*B基因[16]，

pET-30a-GFP-6×His质粒提供*GFP*报告基因，均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.1.2　引物　所用引物序列见表1。

表1　本文所用引物及序列

Table 1　Primers and sequences used in this article

Primers	Sequences (5′–3′)
TTsHsp-F	ATGGCAAATGAATTAATGGA
TTsHsp-R	TTATTGGATTTCAATATGAT
P_{M137}-F	CTCCTGAATCTATCTATCCTTTATCTCTGGCGGTGTTGAC
P_{M137}-R	TCCATTAATTCATTTGCCATAGCTGTTTCCTGGTTTAAAC
P_{M146}-F	AGAATTACATGTGAGAAATTTTATCTCTGGCGGTGTTGAC
P_{M146}-R	TCCATTAATTCATTTGCCATAGCTGTTTCCTGGTTTAAACGT
P_{M193}-F	GTAACGAAAGAGGATAAACCTTATCTCTGGCGGTGTTGAC
P_{M193}-R	TCCATTAATTCATTTGCCATCTTGTCTCTCCTGGTTTAAAC GT
P_{L}-F	GGAAGGAGCTGACTGGGTTGCTCAATTGTTATCAGCTATG CGC
P_{L}-R	TCCATTAATTCATTTGCCATGGTGGTCAGTGCGTCCTGCT
pET-F	TGCCACCGCTGAGCAATAAC
pET-R	GGTTTATCCTCTTTCGTTAC
GFP-F	CCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACT
GFP-R	CGAGTTTGTATAGTTCATCC
ccdB-F	AGCAGGACGCACTGACCACCATGCAGTTTAAGGTTTACA CCTATA
ccdB-R	CTAGATCCTTTACGCGTTCGTTATATTCCCCAGAACATCA GGTTA

1.1.3　试剂　2×Rapid *Taq* Master Mix，购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；PrimeSTAR MaxDNA Polymerase，购自北京宝日医生物技术有限公司；琼脂糖凝胶回收试剂盒，购自广州飞扬生物工程有限公司；*Dpn* I酶，购自上海碧云天生物技术股份有限公司；Minerva Super Fusion Cloning Kit，购自苏州宇恒生物科技有限公司；考马斯亮蓝蛋白胶快速染色液（免脱色），货号HW-PS001，购自天津华蔚科技有限公司；6×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液，购自上海碧云天生物技术股份有限公司；质粒小提试剂盒，购自北京天根生化科技有限公司；酵母粉、胰蛋白胨、氯化钠、琼脂粉、葡萄糖和丁二酸均为分析纯（AR），购自国药集团化学试剂有限公司；碳酸钙，购自上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.1.4　培养基　LB培养基：10 g/L蛋白胨，5 g/L酵母粉，5 g/L氯化钠。NBS固体培养基：NBS[17]，20 g/L葡萄糖，2 g/L酵母粉，18 g/L琼脂粉。NBS种子培养基：NBS[17]，20 g/L葡萄糖，2 g/L酵母粉。NBS发酵培养基：NBS[17]，40 g/L葡萄糖，2 g/L酵母粉，40 g/L碳酸钙，4–8颗玻璃珠。

1.1.5　设备　SBA-40D生物传感仪，山东省科学院生物研究所；Waters e2695型高效液相色谱仪，美国Waters公司；Xtimate® Sugar-H色谱柱，上海月旭科技股份有限公司，Varioskan LUX多功能酶标仪，赛默飞世尔科技公司。

1.2　*方法*

1.2.1　小热休克蛋白的筛选

1.2.1.1　SDS-PAGE评价不同小热休克蛋白表达量　将含有表达不同小热休克蛋白的重组质粒转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞，转化子于含50 μg/mL卡那霉素的新鲜培养基，37 ℃、180 r/min振荡培养，待菌液OD_{600}达0.2–0.4时，加入终浓度1 mmol/L的IPTG诱导5 h，随后12 000 r/min离心10 min收集细胞，所收集的细胞用50 mmol/L Tris-HCl（pH 7.5）洗涤2次并重悬于相同缓冲液，冰浴条件下超声破碎。粗裂解物于4 ℃、12 000 r/min离心30 min，分离上清（可溶性组分）与沉淀（不溶性组分）。上清直接取5 μL样品，而沉淀重悬后取5 μL样品，与6×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液混合，100 ℃加热10 min后进行SDS-PAGE分析（12% 聚丙烯酰胺凝胶），SDS-PAGE电泳条带染色采用考马斯亮蓝快速染色液，相关操作步骤参照产品说明书进行，通过染色条带的深浅判断产物的表达量。

1.2.1.2　小热休克蛋白表达对宿主耐热性的影响

（1）不同小热休克蛋白对宿主热应激的影响。以含有pET-28a(+)质粒的*E. coli* BL21(DE3)作为对照，将含有不同热休克蛋白的载体的*E. coli* BL21(DE3)菌株分别接种入50 mL含有50 μg/mL卡那霉素的LB培养基中，30 ℃培养4 h培养OD_{600}至0.6–0.8，按每管100 μL分装，置于52 ℃水浴热处理，分别在热处理0、5、30 min后各取一管，对菌液进行10倍系列梯度稀释，取10 μL梯度稀释液点滴接种于固体LB培养基上，37 ℃培养过夜，进行菌落计数。以0 min菌落数作为总菌数，分别计算5 min及30 min热激处理后菌落的存活率[8]。

（2）不同小热休克蛋白对宿主高温培养的影响。将含有不同热休克蛋白的载体的*E. coli* BL21(DE3)

菌株30 ℃培养至OD_{600}为0.6左右，置于45 ℃、200 r/min培养，每隔4 h取一次样并测OD_{600}值，以含pET-28a(+)质粒的*E. coli* BL21(DE3)作为对照（CK），通过OD_{600}值比较不同小热休克蛋白对宿主高温培养的影响[1]。

1.2.1.3 小热休克蛋白序列比对 通过NCBI（www.ncbi.nlm.nih.gov）获取不同来源小热休克蛋白（sHsp）及大肠杆菌w系菌株自身的小热休克蛋白IbpA和IbpB的氨基酸序列，使用MEGA5.1.0软件进行序列比对。选用硫化叶菌（*Sulfolobus solfataricus*）的SsHsp20.1 ACD（4-RZK）晶体结构作为结构域模板[18]，通过（https://www.rcsb.org/）找到该模板PDB文件，用（https://espript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi）将比对后的氨基酸序列文件（FAS格式）和结构PDB文件导入，对比各种热休克蛋白在该结构域的氨基酸序列。

1.2.2 启动子强度对热休克蛋白表达的影响

（1）不同启动强度小热休克蛋白表达载体的构建。以pET-28a-TT质粒为模板，以TTsHsp-F/R为引物扩增小热休克蛋白的核酸序列；以pET-28a-P_{M193}-*tkt*为模板，引物P_{M193}-F/R扩增P_{M193}启动子；以pET-28a-*kan*^{r}-P_{M146}-*idi*-P_{M137}为模板，再分别以引物P_{M146}-F/R和引物P_{M137}-F/R扩增启动子P_{M146}片段和启动子P_{M137}；以pET-28a(+)载体为模板，pET-F/R为引物通过反向PCR对载体进行线性化，去除原有T7启动子只保留质粒骨架。所有PCR均遵循PrimeSTAR Max DNA Polymerase说明书设定反应条件，按照*Dpn* I酶说明书对PCR产物进行处理，处理产物依照琼脂糖凝胶回收试剂盒说明书进行切胶回收。

借助无缝克隆连接载体和基因片段，将pET-28a(+)线性化片段分别与启动子（P_{M137}、P_{M193}、P_{M146}）和TT的*sHsp*基因片段进行Gibson无缝克隆操作，上述克隆操作均按照Minerva Super Fusion Cloning Kit的说明书进行，克隆子均使用菌落PCR进行鉴定并进一步送擎科公司Sanger测序验证。

（2）不同启动强度小热休克蛋白表达对宿主耐热性的影响。成功构建的质粒分别电转化到*E. coli* HBUT-LL菌株中，将得到的工程菌株分别命名为P_{M146}-sHsp、P_{M137}-sHsp和P_{M193}-sHsp，参照1.2.1.2评价热休克蛋白表达对宿主耐热性的影响。

（3）不同启动强度小热休克蛋白对宿主产酸的影响。种子培养：将P_{M146}-sHsp、P_{M137}-sHsp和P_{M193}-sHsp在LB平板划线1–2代活化后，接种到50 mL的NBS种子培养基，30 ℃，200 r/min过夜培养（约12–14 h）。

摇瓶发酵：按2%的接种量，将不同菌株的种子分别接入50 mL的NBS发酵培养基，在30 ℃培养4 h，随后将摇床温度提升至45 ℃，200 r/min发酵培养，培养过程定时取样测定发酵液的L-乳酸含量[1]。

L-乳酸含量采用高效液相色谱法（HPLC）测定：发酵取样样品用6%的硫酸水溶液按体积比1∶1混合，振荡混匀后静置数分钟，10 000 r/min离心10 min，收集上清液经0.22 μm微孔滤膜过滤，使用Waters e2695高效液相色谱仪检测发酵液中有机酸含量。液相色谱配备Welch Xtimate® Sugar-H 7.8×300 mm色谱柱（7.8 mm×300 mm，9 μm），以5 mmol/L H_2SO_4为流动相，PDA检测器，柱温维持45 ℃，流速0.5 mL/min，进样量10 μL。

（4）不同强度启动子驱动小热休克蛋白表达对宿主极限高温耐热性的影响。将出发菌株（CK）与3株工程菌株P_{M146}-sHsp、P_{M137}-sHsp和P_{M193}-sHsp在48、50和52 ℃下培养12 h，重复3次，评价不同强度启动子驱动小热休克蛋白表达对宿主极限高温耐热性的影响。

1.2.3 小热休克蛋白动态表达对大肠杆菌热稳定性的影响

1.2.3.1 用于动态表达的启动子P_L性能评估

（1）P_L启动子与报告基因连接。以pSIM6质粒为模板，引物P_L-F/R扩增P_L启动子；以pEcgRNA质粒为模板，引物ccdB-F/R扩增得到致死基因*ccdB*；以pET-30a-GFP-6×His质粒为模板，以GFP-F/R引物扩增*GFP*显色报告基因；以去除T7启动子的线性化pET-28a(+)载体做骨架，分别将P_L启动子连接到*ccdB*和*GFP*两个报告基因上，无缝克隆所用方法同上，所得载体分别命名为pET-28a-P_L-*ccdB*和pET-28a-P_L-*GFP*。

（2）P_L启动子通过致死基因评估其性能。将质粒pET-28a-P_L-*ccdB*转化到大肠杆菌*E. coli* HBUT-LL中，所得菌株取50 mL菌液，在含卡那霉素的LB培养基30、37、42和45 ℃分别培养，定时取样测定OD_{600}的值，通过OD_{600}值变化评估P_L启动子驱动

*ccdB*基因的表达强度。

（3）P_L启动子通过绿色荧光蛋白评估其性能。将质粒pET-28a-P_L-GFP转化到大肠杆菌*E. coli* HBUT-LL中，所得菌株取50 mL菌液，在含卡那霉素的LB培养基30、37、42和45 ℃分别培养到OD_{600}约为0.6时，通过Varioskan LUX多功能酶标仪测定其荧光强度，激发光为488 nm，发射光为505 nm，通过荧光强度与OD_{600}的比值来检测温敏性启动子P_L在不同温度下的启动强度。

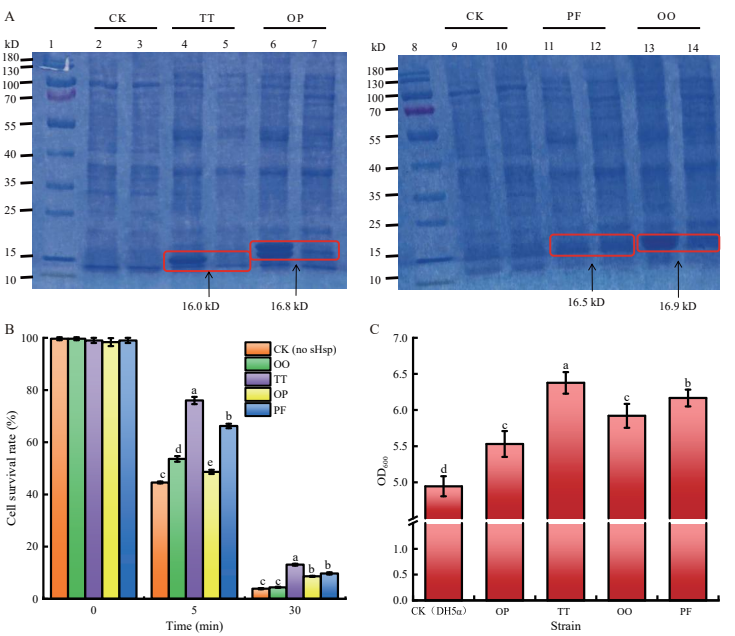
1.2.3.2　P_L启动子驱动小热休克蛋白的表达　以pET-28a-TT为模板，以TTsHsp-F/R为引物扩增小热休克蛋白的核酸片段；将上述除T7启动子的线性化pET-28a载体做骨架，将P_L启动子连接小热休克蛋白核酸片段，无缝克隆所用方法同上，所得载体命名为pET-28a-P_L-TT(sHsp)，评价pET-28a-P_L-TT(sHsp)载体对宿主热应激及小热休克蛋白对宿主产酸的影响。

2　结果

2.1　小热休克蛋白的筛选

本研究对4种菌株的小热休克蛋白进行了对比筛选。经过诱导表达后，所有小热休克蛋白均在*E. coli* BL21(DE3)中[8]实现了较好的可溶性表达，包涵体较少（图1-A）。

为进一步评估小热休克蛋白表达对大肠杆菌高温耐受性的影响，采用52 ℃热应激实验以及高温培养来进行验证。结果显示，4种小热休克蛋白热激下的存活率均显著高于对照菌株（P<0.05），其中来源于TT菌株的小热休克蛋白效果最佳，在该蛋白表达条件下，宿主菌株经52 ℃热激5 min和30 min后的存活率，分别较对照菌株提升72%和225%（图1-B），45 ℃高温培养实验中也得到类似结果，生长至20 h时，表达TT菌株小热休克蛋白的宿主菌株，其表征生物量的OD_{600}可达6.33±0.14，相较对照菌株提



A：不同小热休克蛋白在*E. coli* BL21(DE3)中的表达，1、8：180 kD蛋白Marker；2、4、6、9、11和13：细胞裂解后的上清；3、5、7、10、12和14：细胞裂解后的沉淀。B：小热休克蛋白表达对宿主在52 ℃热激下存活率的影响；C：小热休克蛋白的表达对宿主在45 ℃培养条件下生物量的影响。TT、OO、PF、OP：分别为*Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4、*Oenococcus oeni*、*Pyrococcus furiosus*、*Oceanithermus profundus*的小热休克蛋白

A: Expression of different small heat shock proteins in *E. coli* BL21(DE3). Lanes 1 and 8: 180 kD protein marker; 2, 4, 6, 9, 11, 13: supernatant after cell lysis; 3, 5, 7, 10, 12, 14: pellet after cell lysis. B: Effect of small heat shock protein expression on host cell survival under heat shock at 52 ℃. C: Effect of small heat shock protein expression on host biomass under cultivation at 45 ℃. TT, OO, PF and OP refer to the small heat shock proteins derived from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4, *Oenococcus oeni*, *Pyrococcus furiosus* and *Oceanithermus profundus*, respectively

图1　小热休克蛋白的筛选

Fig. 1　Screening of small heat shock proteins

升了24.4%（图1-C）。

2.2 小热休克蛋白氨基酸多序列比对

为明确不同来源小热休克蛋白耐热性存在差异的分子基础，以及TT-sHsp发挥最优耐热功能的结构特征，以SsHsp20.1 ACD（4-RZK）晶体结构为模板，对4种外源sHsp（TT、OO、OP、PF）及大肠杆菌内源小热休克蛋白IbpA、IbpB进行氨基酸序列多序列比对（图2），分析主要聚焦小热休克蛋白核心功能域α-晶体结构域（ACD）。结果发现4种外源sHsp的β3片层序列中均存在保守的Pro-Gly（PG）柔性片段，而大肠杆菌内源IbpA、IbpB的β3片层对应位置无PG片段，分别被Val-Ala（IbpA）、Ile-Leu（IbpB）刚性氨基酸组合替代，这可能是外源sHsp与大肠杆菌内源sHsp耐热功能存在显著差异的结构基础。TT-sHsp的PG片段侧翼氨基酸组成具有一定独特性，β2片层序列所有小热休克蛋白有一个共有氨基酸P（脯氨酸），但TT-sHsp这个位置为M（甲硫氨酸）；β6片层序列其他外源小热休克蛋白有一个共有序列LP（亮氨酸–脯氨酸），TT-sHsp为VP（缬氨酸–脯氨酸），与之对应两种大肠杆菌来源的小热休克蛋白对应位置为LA（亮氨酸–丙氨酸），上述差异尚未见文献报道，可能是TT-sHsp实现高效耐热功能的重要结构特征。

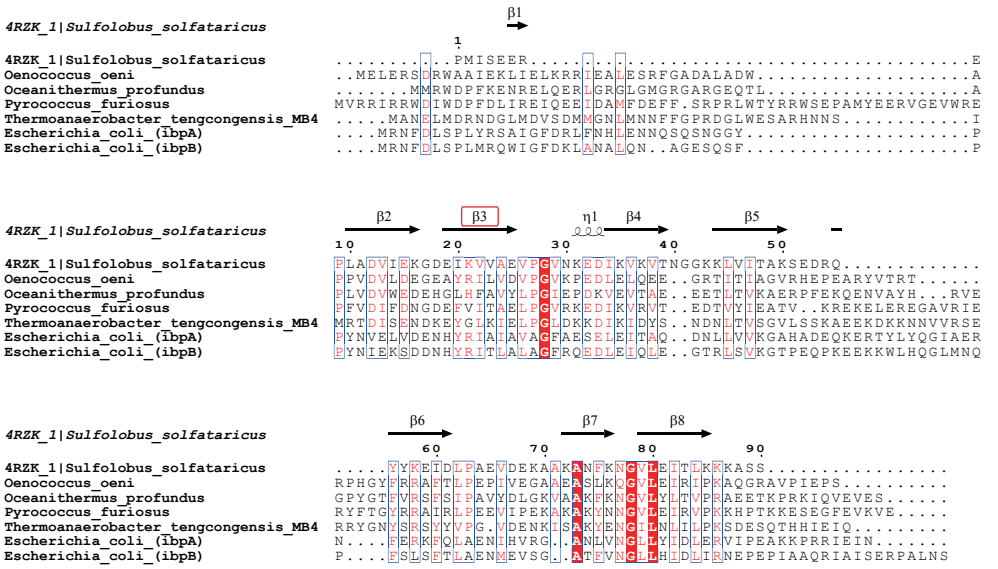


图2 小热休克蛋白氨基酸多序列比对

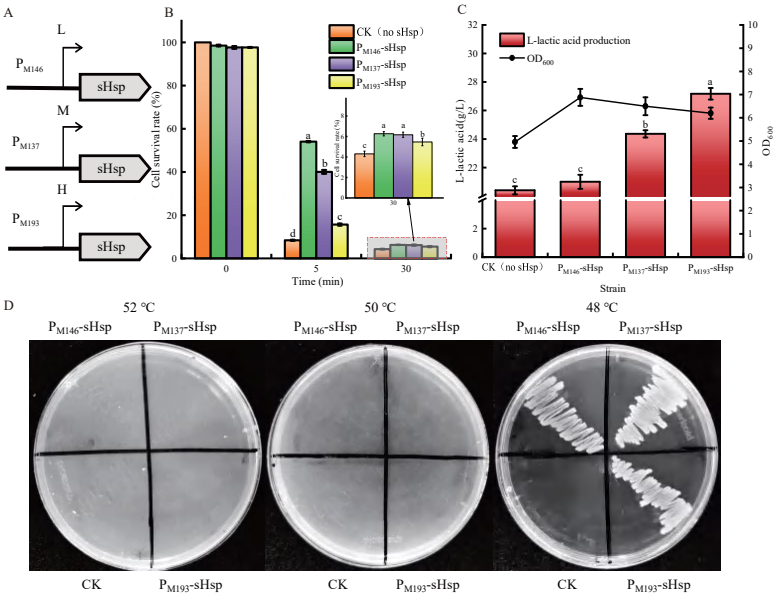
Fig. 2 Multiple sequence alignment of amino acid for small heat shock proteins

2.3 不同启动强度小热休克蛋白表达对宿主耐热性的影响

选用3种不同启动强度的组成型启动子P_{M146}、P_{M137}、P_{M193}来驱动小热休克蛋白的表达（图3-A），其启动强度分别为大肠杆菌 *lacZ* 基因启动子的1.7倍、2.5倍、5倍[19]，不同启动强度的组成型启动子驱动TT来源小热休克蛋白，其宿主在高温胁迫下的存活率显著高于未表达小热休克蛋白的对照。其中，以弱启动子P_{M146}驱动表达的小热休克蛋白的工程菌在52 ℃热激5 min时，其存活率相较于出发菌株提升90%；52 ℃热激30 min时，存活率相较于出发菌株仍提升30%（图3-B）。

在45 ℃发酵20 h条件下，所有组成型启动子表达小热休克蛋白的工程菌均提高了宿主的生物量，提高幅度为25%–38.1%，表明即使弱启动子驱动小热休克蛋白表达也具有提高细胞耐热性的能力，且使用最低强度的启动子P_{M146}获得了最大的菌体量（图3-C），相对于出发菌株其生物量（OD_{600}）提升了38.1%，但最高强度的启动子P_{M193}驱动小热休克蛋白表达时，L-乳酸产量最高，达到28.4±0.25 g/L，相较于出发菌株提升了44.1%。

进一步测试了组成型启动子在更高温度下的耐



A：不同强度的启动子表达小热休克蛋白sHsp的示意图；B：在52 ℃热应激条件下不同强度启动子驱动小热休克蛋白表达对宿主存活率影响；C：不同组成型启动子驱动小热休克蛋白表达对乳酸45 ℃发酵的影响；D：不同强度启动子驱动小热休克蛋白表达对宿主最高温度耐受度的影响

A: Schematic diagram of small heat shock protein (sHsp) expression driven by promoters of different strengths. B: Effects of the expression of small heat shock proteins driven by promoters of different strengths on host cell survival rate under 52 ℃ heat stress. C: Effects of the expression of small heat shock proteins driven by different constitutive promoters on lactic acid fermentation at 45 ℃. D: Effect of different strength promoters driving the expression of small heat shock proteins on the host maximum temperature tolerance

图3　不同启动子表达小热休克蛋白对宿主耐热性影响

Fig. 3　Effects of heat shock protein expression driven by different promoters on host thermotolerance

热性能及高温生长极限。结果显示，异源表达sHsp的3株大肠杆菌工程菌株（P_{M137}-sHsp、P_{M146}-sHsp、P_{M193}-sHsp）可在48 ℃条件下正常生长，而在50 ℃及52 ℃条件下均无法生长；对照组（CK）在所有测试温度下均未见生长（图3-D）。

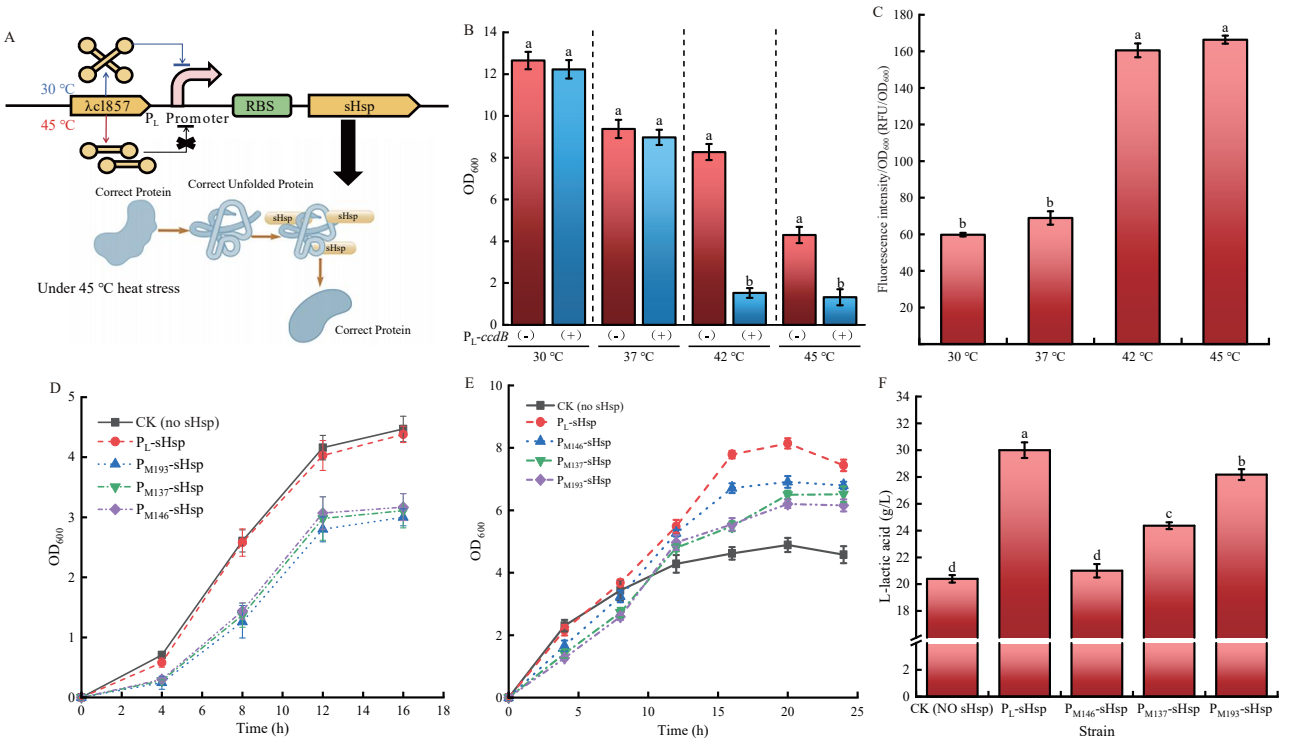
2.4　温敏性启动子驱动小热休克蛋白表达宿主耐热性的影响

温敏启动子具有良好的动态表达能力，在30 ℃较低的温度下，P_L启动子的阻遏蛋白CI857具有活性，RNA聚合酶转录较少；高于42 ℃条件下CI857失活不再阻遏P_L启动子，目标蛋白转录水平高（图4-A）。尽管P_L启动子已有较广泛的应用，但其在30–45 ℃的启动性能仍未作系统评估。本文分别采用致死基因（*ccdB*）和绿色荧光蛋白（*GFP*）作为报告基因，评估了温敏性P_L启动子的温度依赖性。

当用致死基因*ccdB*作报告基因时，重组菌株的生物量会随着温度的升高而下降（图4-B）。在30 ℃时，含*ccdB*基因的重组菌株最大OD_{600}值为12.13±0.44，原始出发菌株则为12.5±0.41，此时重组菌株的致死率仅为3%，表明30 ℃下P_L启动子虽被普遍认为处于“关闭”状态，但仍存在少量渗漏表达；升高温度到37 ℃时，重组菌株最大OD_{600}值为7.87±0.36，其致死率提升到37.0%。在42 ℃与45 ℃时，含*ccdB*基因的重组菌株最大OD_{600}值分别为1.5±0.23和1.32±0.32，致死率为88.0%和89.4%。

而荧光蛋白作为报告基因时，重组菌株的比荧光强度会随着温度的升高而升高。在30、37、42和45 ℃时的比荧光强度分别为60.74±0.92（RFU/OD_{600}）、72.8±3.67（RFU/OD_{600}）、160±3.7（RFU/OD_{600}）和163±1.64（RFU/OD_{600}），30 ℃与37 ℃之间，42 ℃与45 ℃之间的比荧光强度无明显差异（P>0.05）（图4-C）。从报告基因的研究结果可知，该P_L启动子在30–45 ℃条件下，动态范围为2.68。P_L启动子在42 ℃和45 ℃下启动能力强，调控温度变化范围广，适合动态表达需要高温才响应的小热休克蛋白，因此本文将前期筛选到TT的小热休克蛋白置于P_L启动子进行动态表达。

为了研究在启动子“关闭”阶段是否影响到生



A:温敏性启动子P_L动态调控示意图[20];B–C:致死基因*ccdB*(B)和绿色荧光蛋白GFP(C)分别作为报告基因测试P_L启动子的温控性能;D:P_L启动子相对于组成型启动子在种子阶段30 ℃培养对宿主生物量的影响;E:P_L启动子相对于组成型启动子在发酵阶段45 ℃下培养对宿主生物量的影响;F:P_L启动子相对于组成型启动子对L-乳酸产量的影响

A: Schematic diagram of dynamic regulation of thermosensitive promoter P_L [20]. B-C: Evaluation of the temperature-controlled performance of the P_L promoter using the lethal gene *ccdB* (B) and green fluorescent protein GFP (C) as reporter genes. D: Effect of the P_L promoter on host biomass in comparison with a constitutive promoter during seed culture at 30 ℃. E: Effect of the P_L promoter on host biomass in comparison with a constitutive promoter during fermentation at 45 ℃; F: Effect of the P_L promoter on L-lactic acid production in comparison with a constitutive promoter

图4 温敏性启动子P_L对小热休克蛋白表达耐受发酵产酸情况

Fig. 4 Effects of thermosensitive promoter P_L mediated heat shock protein expression on acid production during stress-tolerant fermentation

长，采用30 ℃培养种子，以不表达小热休克蛋白的宿主及组成型表达小热休克蛋白的宿主作为对照，观察种子培养阶段不同宿主的生物量，结果显示，30 ℃条件下，以P_L启动子驱动小热休克蛋白表达的重组大肠杆菌，其生物量与未携带小热休克蛋白的出发菌株无显著性差异（P>0.05）（图4-D）；但显著优于组成型启动子介导小热休克蛋白表达的重组菌株，这表明组成型表达确实对宿主生长造成了负担。

随后这些种子转入发酵培养基，选用45 ℃下发酵来评估小热休克蛋白诱导表达对L-乳酸的生物量（图4-E）和产量（图4-F）的影响。P_L对小热休克蛋白的动态表达显著地提高菌体的生物量（P<0.05），宿主L-乳酸产量达30±0.58 g/L，最大生物量（OD_{600}）达8.1±0.32，相较于组成型启动子，生物量和L-乳酸产量分别提升了17%–30%和6%–30%；对比不含小热休克蛋白的出发菌株，生物量和L-乳酸产量分别提升了62%和32%，这表明，P_L启动子在30 ℃种子培养阶段不表达小热休克蛋白，可避免组成型表达带来的生长负担；而在45 ℃发酵阶段诱导表达后，能显著提高菌体生物量与L-乳酸产量，效果优于组成型表达菌株及作为对照的出发菌株。

3 讨论

小热休克蛋白的筛选对提高大肠杆菌耐热性有着十分重要的意义，有研究筛选12种不同的小热休克蛋白后发现，源自深海海洋栖热菌*Oceanithermus*

profundus（缩写为OP）的小热休克蛋白在*E. coli* BL21(DE3)宿主中表达效果良好，且能显著提高大肠杆菌的耐热性[8]，此外，来自*Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4[12]（缩写为TT）、*Oenococcus oeni*[1]（缩写为OO）和*Pyrococcus furiosus*[11]（缩写为PF）的小热休克蛋白也表现出较好的耐热性能。结合本研究筛选结果，TT来源的小热休克蛋白对大肠杆菌耐热性的提升效果最为显著，为探究小热休克蛋白提升大肠杆菌耐热性的分子基础，进一步对小热休克蛋白的结构域进行了同源序列比对，并对影响小热休克蛋白功能的α-晶体结构域（α-crystallin domain，ACD）进行了重点分析。小热休克蛋白具有8个β片层[21]，在β3片层序列中，PG序列（Pro-Gly片段）在所有的外源小热休克蛋白中都存在。Pro-Gly片段被认为能提高小热休克蛋白（sHsp）分子柔性，使“sHsp-底物复合物”结构更松散[22]，进而使“sHsp-底物复合物”结构更易被大肠杆菌的*DnaK*识别，蛋白聚集体因而拆解为小的可溶性片段，并从“sHsp-底物复合物”上解离，使后续*ClpB*的解聚效率更高[23]，这一机制可能是外源小热休克蛋白增强大肠杆菌耐热性的核心路径之一。由此可见，PG序列是提升大肠杆菌耐热性的关键结构片段，但大肠杆菌自有的小热休克蛋白（IbpA和IbpB）并没有PG序列，对应位置被Val-Ala（IbpA）或Ile-Leu（IbpB）等刚性氨基酸组合替代，也从一个角度解释了一些耐热菌株比大肠杆菌更耐热的原因[24]，这为后续通过分子改造增强大肠杆菌耐热性提供了重要的靶点参考。尽管本文中筛选到的最优的小热休克蛋白（来自TT菌）在β2和β6片层序列与其他菌属的小热休克蛋白存在部分氨基酸的差异，但是目前尚无法据此推断TT-sHsp显著提升宿主大肠杆菌耐热性的分子机制，通过人工智能及机器学习的方法已有不少尝试探究该机制，但受限于小热休克蛋白序列–功能数据集规模较小，仍需通过其他方式进一步挖掘性能更优异的小热休克蛋白。

筛选获得适宜的小热休克蛋白后，选择合适的启动子驱动其表达成为亟待解决的关键问题。常见的小热休克蛋白启动子如表2所示。

表2　常见的小热休克蛋白启动子

Table 2　Common promoters for small heat shock proteins

启动子 Promoter	热休克蛋白 Heat shock protein	来源 Source	特点 Characteristics	参考文献 References
T7	Hsp20	*Tepidimonas sediminis*（沉积物暖单胞菌）	强表达；泄漏表达、IPTG依赖、代谢负担重、菌株限制	[8]
P_{Lac}	IbpA/IbpB	*Escherichia coli*	适应菌株范围广；IPTG依赖	[25]
P_{IbpA}	IbpA/IbpB	*Escherichia coli*	σ32调控，在受到胁迫时才表达，生长负荷小；诱导温度严格、表达时间窗口窄	[26]
P_{gapA}	Hsp20	*Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4	适用菌株范围广，组成型强表达，σ32/σ70双调控	[12]
P_{L}	Hsp20	*Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4	无需诱导剂，通过温度控制，使小热休克蛋白在生长阶段和发酵阶段处于不同开关状态，减少生长期间负荷；生长阶段必须控制在较低温度30 ℃，会一定程度影响生长	本研究

目前，多数小热休克蛋白的异源表达常选用T7启动子。该启动子可使小热休克蛋白在适配T7聚合酶的BL21(DE3)宿主中实现高效表达，蛋白表达量可达总蛋白量的40%–50%，在热应激实验和高温发酵测试中均能有效提升宿主耐热性能。然而，该启动子存在明显局限性，其仅适用于含T7聚合酶的宿主，对于工业微生物常用的大肠杆菌W、MG1655及C菌株，无法直接应用，尽管可通过在这些大肠杆菌基因组中插入T7聚合酶基因片段解决这一问题[27]，但极高的蛋白表达量仅适用于蛋白表达分析及检测，对于工业微生物而言，反而会过度消耗菌株胞内资源，进而影响相关产物的发酵与合成[28]。除此之外，诱导型启动子如P_{lac}启动子也是一种可选方案，P_{lac}启动子虽然启动能力不如T7启动子，但作为一种诱导型启动子在平衡生长和蛋白表达比组成型启动子仍然具有一定优势[25]，但由于P_{lac}启动子还是需要IPTG诱导，从工业生产成本角度考虑，其并不适用于工业微生物的大规模应用。

相比之下，P_{IbpA}作为热应激诱导的启动子，无需IPTG作为诱导剂。但该启动子存在诱导温度要求严格、表达时间窗口窄的缺陷，限制了其实际应用[29]。另外，组成型启动子表达无需诱导物，P_{gapA}启动子驱动小热休克蛋白表达时，拓宽了工程菌最适生长温度的范围（37–43 ℃），较大程度提高了大肠杆菌的耐热性[12]，但该启动子启动能力较强，可能对微生物生长产生一定不利影响。

相较于上述诱导型及热应激诱导型启动子，组成型启动子因无需诱导物的优势更具工业应用潜力。为此，本文选用了3种组成型启动子（P_{M146}、P_{M137}、P_{M193}）来启动小热休克蛋白的表达，这3种组成型启动子启动强度分别相对于大肠杆菌*lacZ*基因启动子的1.7倍、2.5倍、5倍[19]，组成表达无需诱导剂，且通过这种不同启动强度的启动子，可评估小热休克蛋白表达水平是否满足热应激环境的需求。通过本文结果数据来看，启动强度最低的P_{M146}启动子获得了最大的菌体量，相对于对照菌株，提升了38.1%，这可能与低强度启动子驱动外源基因表达会带来较低的生长负荷有关[30]，从图1中小热休克蛋白表达情况和宿主生物量之间的关系也印证了这点，OO和OP小热休克蛋白表达条带较浓，但对应宿主生物量却最低，不过，非小热休克蛋白表达量越低，宿主生物量就越高；TT-sHsp的表达量并非最低，却能使宿主获得较高的生物量，这可能与不同小热休克蛋白表达对细胞负荷差异有关，不同小热休克蛋白本身性质不同，即使表达量相似，对细胞压力/保护效果也不一样。值得注意的是，即使表达时宿主生物量小，但最高强度的启动子P_{M193}驱动小热休克蛋白表达时，L-乳酸产量也达到28.4±0.25 g/L，相较于出发菌株提升了44.1%。尽管有机酸发酵产量往往与生物量相关联，但更高的热休克蛋白表达水平，可能使微生物在高温发酵时细胞状态更稳定，进而实现低生物量下的高乳酸产量。

组成型表达极端嗜盐菌的小热休克蛋白时发现会导致大肠杆菌生长缓慢[31]，因此动态表达小热休克蛋白是一种较佳策略，在生长期不表达小热休克蛋白，而在发酵阶段表达小热休克蛋白，这样可大大降低小热休克蛋白表达带来的生长负荷。

相较于前文提及的组成型启动子，温敏启动子具有独特优势，源自噬菌体的P_L启动子不仅启动强度高，还具有动态表达特性，兼具类似“诱导型”启动子的特性，且无需添加诱导剂，更适合小热休克蛋白这类抗逆基因的动态表达。本文首先以致死基因（*ccdB*）和绿色荧光蛋白（GFP）作为报告基因，评估了30–45 ℃ P_L启动子的温度依赖性，一般认为，30 ℃ P_L启动子处于“关闭”状态，42 ℃启动子处于开放状态[32]，两个报告基因的实验结果基本验证了这一特性，但对比30 ℃和37 ℃两个温度，荧光蛋白报告基因表达无显著差异，在一些文献中37 ℃作为启动子“开放”温度去驱动一些基因表达[33]，考虑到启动子的表达强度还与培养基种类、培养基pH范围、溶氧量等因素相关[34]，这可能是导致学界对37 ℃时P_L启动子状态存在分歧的原因，而42 ℃和45 ℃，恰好是多种微生物的热应激阈值温度[35]，因此更适合驱动小热休克蛋白表达，从而帮助宿主快速适应热激环境、提升耐热性能。

本文设计的发酵策略：30 ℃培养微生物，45 ℃高温发酵，结果表明，温敏启动子P_L驱动下的宿主生物量和L-乳酸产量比组成型启动子分别提升了17%–30%和6%–30%。通过温度的变化实现动态发酵，可使种子生长阶段小热休克蛋白不表达或低表达，高温发酵阶段高效表达，从而实现宿主生长与产酸的平衡。相较于组成型启动子驱动的小热休克蛋白表达，温敏启动子对高温发酵具有更好的适配性。

4 结论

本研究通过构建PL启动子驱动的TT-sHsp动态表达系统，显著提升了大肠杆菌的高温发酵性能。45 ℃发酵条件下，工程菌L-乳酸产量达30±0.58 g/L，最大生物量（OD_{600}）达8.1±0.32，与强组成型启动子PM193调控相比分别提升6%和17%。该动态调控策略可在提升宿主耐热性的同时兼顾生长与合成性能，为工业微生物的耐热性改造提供了高效、可行的技术思路。

参考文献

[1] Li Y, Xu XG, Qu R, et al. Heterologous expression of *Oenococcus oeni* sHSP20 confers temperature stress tolerance in *Escherichia coli* [J]. Cell Stress Chaperones, 2018, 23(4): 653-662.

[2] Sánchez-Adriá IE, Sanmartín G, Prieto JA, et al. Sourdough yeast strains exhibit thermal tolerance, high fermentative performance, and a distinctive aromatic profile in beer wort [J]. Foods, 2024, 13(7): 1059.

[3] Zhang B, Geberekidan M, Yan Z, et al. Very high thermotolerance of an adaptive evolved *Saccharomyces cerevisiae* in cellulosic ethanol fermentation [J]. Fermentation, 2023, 9(4): 393.

[4] Pan RZ, Yuan YC, Xu AM, et al. Biofilm engineering to improve succinic acid production in *Escherichia coli* by enhancing extracellular polysaccharide synthesis [J]. Bioresour Technol, 2025, 431: 132627.

[5] Sun WJ, Chen Y, Li MK, et al. Integration of (S)-2,3-oxidosqualene enables *E. coli* to become Iron Man *E. coli* with improved overall tolerance [J]. Biotechnol Biofuels, 2023, 16: 191.

[6] Kurokawa N, Ogawa M, Midorikawa R, et al. A study on the temperature-dependent behavior of small heat shock proteins from methanogens [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(12): 5748.

[7] Ahn YJ, Im E. Heterologous expression of heat shock proteins confers stress tolerance in *Escherichia coli*, an industrial cell factory: a short review [J]. Biocatal Agric Biotechnol, 2020, 29: 101833.

[8] Sato Y, Okano K, Honda K. Effects of small heat shock proteins from thermotolerant bacteria on the stress resistance of *Escherichia coli* to temperature, pH, and hyperosmolarity [J]. Extremophiles, 2024, 28: 12.

[9] Kruglikov A, Wei YL, Xia XH. Proteins from thermophilic *Thermus thermophilus* often do not fold correctly in a mesophilic expression system such as *Escherichia coli* [J]. ACS Omega, 2022, 7(42): 37797-37806.

[10] Blum P, Ory J, Bauernfeind J, et al. Physiological consequences of DnaK and DnaJ overproduction in *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 1992, 174(22): 7436-7444.

[11] Laksanalamai P, Maeder DL, Robb FT. Regulation and mechanism of action of the small heat shock protein from the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* [J]. J Bacteriol, 2001, 183(17): 5198-5202.

[12] 孙翔英, 刘月芹, 孙欢, 等. 大肠杆菌耐热元器件的构建及其应用 [J]. 化工学报, 2014, 65(8): 3128-3135.
Sun XY, Liu YQ, Sun H, et al. Construction of heat resistance devices for *Escherichia coli* and their application [J]. CIESC J, 2014, 65(8): 3128-3135.

[13] 王金华, 王永泽, 赵筱, 等. 高效利用蔗糖生产L-乳酸的大肠杆菌及应用: CN115873773A [P]. 2023-03-31.

[14] Zou SY, Chen WQ, Cao Y, et al. Lethal endotoxin (ccdB) based counterselection improved the efficiency of sequential gene editing in *Escherichia coli* [J]. Biotechnol Lett, 2025, 47(5): 118.

[15] Datta S, Costantino N, Court DL. A set of recombineering plasmids for gram-negative bacteria [J]. Gene, 2006, 379: 109-115.

[16] Jiang Y, Qian FH, Yang JJ, et al. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum* [J]. Nat Commun, 2017, 8: 15179.

[17] 刘利, 陈炜琪, 邹诗瑶, 等. 亚磷酸脱氢酶表达对大肠杆菌琥珀酸发酵的影响 [J]. 中国调味品, 2025, 50(1): 210-215.
Liu L, Chen WQ, Zou SY, et al. Effect of phosphite dehydrogenase expression on succinic acid fermentation in *Escherichia coli* [J]. China Condiment, 2025, 50(1): 210-215.

[18] Roy M, Bhakta K, Ghosh A. Minimal yet powerful: the role of archaeal small heat shock proteins in maintaining protein homeostasis [J]. Front Mol Biosci, 2022, 9: 832160.

[19] Zhao J, Li QY, Sun T, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β-carotene production [J]. Metab Eng, 2013, 17: 42-50.

[20] Jiang S, Li HQ, Zhang L, et al. Generic Diagramming Platform (GDP): a comprehensive database of high-quality biomedical graphics [J]. Nucleic Acids Res, 2025, 53(D1): D1670-D1676.

[21] Boelens WC. Structural aspects of the human small heat shock proteins related to their functional activities [J]. Cell Stress Chaperones, 2020, 25(4): 581-591.

[22] Gil-Durán C, Ravanal MC, Ubilla P, et al. Heterologous expression, purification and characterization of a highly thermolabile endoxylanase from the Antarctic fungus *Cladosporium* sp. [J]. Fungal Biol, 2018, 122(9): 875-882.

[23] Konieczny I, Liberek K. Cooperative action of *Escherichia coli* ClpB protein and DnaK chaperone in the activation of a replication initiation protein [J]. J Biol Chem, 2002, 277(21): 18483-18488.

[24] Fu XM, Chang ZY. Identification of a highly conserved pro-gly doublet in non-animal small heat shock proteins and characterization of its structural and functional roles in *Mycobacterium tuberculosis* Hsp 16.3 [J]. Biochem Mosc, 2006, 71(S1): S83-S90.

[25] 周帮顺, 王茜, 李海燕, 等. Hsp提高细菌的逆境生存能力和乙醇产量 [J]. 生物技术, 2008, 18(4): 26-29.
Zhou BS, Wang X, Li HY, et al. Effect of heat shock treatment to increase the resistance to adversity and production of ethanol of *E. coli* [J]. Biotechnology, 2008, 18(4): 26-29.

[26] Miwa T, Taguchi H. *Escherichia coli*small heat shock protein IbpA plays a role in regulating the heat shock response by controlling the translation of σ^{32} [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2023, 120(32): e2304841120.

[27] Ting WW, Tan SI, Ng IS. Development of chromosome-based T7 RNA polymerase and orthogonal T7 promoter circuit in *Escherichia coli* W3110 as a cell factory [J]. Bioresour Bioprocess, 2020, 7: 54.

[28] Suo YK, Luo S, Zhang YN, et al. Enhanced butyric acid tolerance and production by Class I heat shock protein-overproducing *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 [J]. J Ind Microbiol

Biotechnol, 2017, 44(8): 1145-1156.

[29] Saltepe B, Bozkurt EU, Hacıosmanoğlu N, et al. Genetic circuits to detect nanomaterial triggered toxicity through engineered heat shock response mechanism [J]. ACS Synth Biol, 2019, 8(10): 2404-2417.

[30] Li ZP, Rinas U. Recombinant protein production associated growth inhibition results mainly from transcription and not from translation [J]. Microb Cell Fact, 2020, 19: 83.

[31] Snoeck S, Guidi C, De Mey M. 'Metabolic burden' explained: stress symptoms and its related responses induced by (over) expression of (heterologous) proteins in *Escherichia coli* [J]. Microb Cell Fact, 2024, 23: 96.

[32] Xu WB, Li SC, Bock R, et al. A heat-inducible expression system for external control of gene expression in plastids [J]. Plant Biotechnol J, 2024, 22(4): 960-969.

[33] Lin TH, Cheng SY, Lin YF, et al. Development of the low-temperature inducible system for recombinant protein production in *Escherichia coli* nissle 1917 [J]. J Agric Food Chem, 2024, 72 (13): 7318-7325.

[34] Reinikainen P, Sevella B, Suutari M, et al. Analysis and modelling of the lambda pL promoter controlled expression of a cloned thermostable α-amylase gene in *Escherichia coli* during batch cultivation [J]. J Biotechnol, 1989, 9(3): 221-234.

[35] Ezemaduka AN, Yu J, Shi X, et al. A small heat shock protein enables *Escherichia coli* to grow at a lethal temperature of 50 C conceivably by maintaining cell envelope integrity [J]. J Bacteriol, 2014, 196(11): 2004-2011.

(责任编辑 朱琳峰)

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):317-327

基于P450scc系统的酿酒酵母从头合成孕烯醇酮细胞工厂的构建与优化

董旭芳[1] 童颖佳[1] 刘伟[1] 史劲松[1] 许正宏[2] 李会[1*]
（1.江南大学生命科学与健康工程学院,无锡 214122; 2.四川大学轻工科学与工程学院,成都 610065）

摘 要： 【目的】孕烯醇酮是多种甾体激素药物合成的关键前体，具有重要的应用价值，但其传统化学合成过程复杂、环境负担较重。以酿酒酵母为底盘构建孕烯醇酮的生物合成体系，为其绿色、高效生产提供新的技术路径。【方法】以实验室前期构建的高产菜油甾醇的酿酒酵母重组菌株CY03为研究对象，引入不同来源的P450scc系统，比较其在酿酒酵母中的催化性能，筛选获得最优酶组合；进一步利用酿酒酵母rDNA多拷贝位点实现P450scc系统的多拷贝整合以提高表达水平；同时尝试通过蛋白融合策略增强CYP87A4与其氧化还原伴侣ATR1之间的电子传递效率；并对培养基碳源、氮源及无机盐等关键因素进行优化，以提升孕烯醇酮合成水平。【结果】洋地黄（*Digitalis lanata*）来源的CYP87A4与拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）来源的ATR1组合表现出最优催化性能，孕烯醇酮产量达3.75 mg/L。通过rDNA位点实现P450scc系统多拷贝整合后，成功筛选到拷贝数为5的工程菌株，将孕烯醇酮产量提升至14.51 mg/L，为单拷贝菌株的3.87倍。蛋白融合策略未能进一步提高孕烯醇酮合成效率。经培养基条件优化，在20 g/L葡萄糖、10 g/L酵母粉、20 g/L蛋白胨并添加0.3 g/L钾离子（K^+）的条件下，孕烯醇酮产量进一步提高至16.82 mg/L。【结论】成功构建并优化了酿酒酵母从头合成孕烯醇酮的生物合成体系，通过P450scc系统来源筛选、多拷贝整合及发酵条件优化显著提高了产量，为甾体类化合物的微生物绿色制造提供了可行的工程策略和实验依据。

关键词： 酿酒酵母；孕烯醇酮；从头合成；培养基优化
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0189

Construction and Optimization of *de novo* Pregnenolone Cell Factory Based on the P450scc System in *Saccharomyces cerevisiae*

DONG Xu-fang[1] TONG Ying-jia[1] LIU Wei[1] SHI Jin-song[1] XU Zheng-hong[2] LI Hui[1*]
（1. *School of Life Science and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi* 214122; 2. *College of Light Industry Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu* 610065）

Abstract: 【Objective】 Pregnenolone serves as a key precursor for synthesizing various steroid hormones, holding significant industrial applications. However, its traditional chemical synthesis process is complex and environmentally burdensome. Constructing a pregnenolone biosynthesis system using *Saccharomyces cerevisiae* as a chassis provides a new technological pathway for its green and efficient production. 【Method】 The recombinant strain CY03 of *S. cerevisiae*, previously constructed in our laboratory for high-yield campesterol production, was taken as the research object. P450scc systems from different sources were introduced into *S. cerevisiae* to compare their catalytic performance, and the optimal enzyme combination was screened out. The multi-copy sites of *S. cerevisiae* rDNA were further utilized to achieve multi-copy integration of the P450scc system, thereby enhancing its expression. Concurrently, we attempted to enhance the electron transport efficiency between CYP87A4 and its redox partner ATR1 using protein fusion strategies. We also optimized key factors in the culture medium, including carbon source, nitrogen source, and inorganic salts, to enhance pregnenolone synthesis. 【Result】 The combination of CYP87A4 from *Digitalis lanata* and ATR1 from *Arabidopsis thaliana* exhibited the best catalytic performance, achieving a pregnenolone titer of 3.75 mg/L. After multi-

收稿日期：2026-02-06
基金项目：国家自然科学基金项目（22578169），中央高校基本科研业务费专项资金资助（JUSRP202504023）
*通信作者：李会 lihui@jiangnan.edu.cn

copy integration of the P450scc system at the rDNA locus, a recombinant strain with a copy number of 5 was successfully screened, which increased the pregnenolone production to 14.51 mg/L, which was 3.87 times higher than that of the single-copy strain. The protein fusion strategy failed to further enhance the efficiency of pregnenolone synthesis. Through optimization of the culture medium conditions, the pregnenolone production was further increased to 16.82 mg/L under the following conditions: 20 g/L glucose, 10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, and 0.3 g/L K^+.【Conclusion】We successfully constructed and optimized a biosynthetic system for *de novo* pregnenolone synthesis in *S. cerevisiae*. By screening P450scc system sources, performing multi-copy integration, and optimizing fermentation conditions, we significantly enhanced the yield. This study provides a feasible engineering strategy and an experimental basis for the green microbial manufacturing of steroid compounds.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; pregnenolone; *de novo* synthesis; culture medium optimization

甾体化合物是广泛存在于自然界中的一类天然产物，其基本母核结构为环戊烷多氢菲[1]。目前，全球甾体类药物品种已超过400种，广泛应用于抗肿瘤、抗炎、抗过敏、免疫调节及生殖发育疾病治疗等领域，是仅次于抗生素的第二大类药物[2-3]。孕烯醇酮是甾体化合物生物合成途径中的关键中间体，也是糖皮质激素、盐皮质激素以及性激素等多种重要甾体药物的共同前体[4]。目前，孕烯醇酮的生产主要依赖于化学合成，合成步骤复杂且伴有环境的污染[5]。随着甾体类药物在临床治疗和健康管理领域中的持续应用，对孕烯醇酮等甾体前体化合物的需求逐渐增长，开发高效、稳定且具有可持续性的生产技术已成为甾体类化合物制造领域的重要研究方向之一[6]。

利用微生物从头合成孕烯醇酮具有碳源简单、投料成本低和底物利用率高等优势，因而被认为是替代传统化学合成的潜在途径[7]。该策略通常以酵母为底盘细胞，基于酵母内源的麦角甾醇合成途径，敲除ERG5并异源表达DHCR7，可实现菜油甾醇的合成。在此基础上，进一步引入细胞色素P450侧链降解系统（P450scc），即可催化甾醇侧链的断裂反应，从而生成孕烯醇酮（图1）。其中，P450scc系统是孕烯醇酮合成的关键限速酶，该系统由一个细胞色素P450依赖性单加氧酶（P450酶）及氧化还原伴侣组成。不同来源的P450scc系统也存在着差异：哺乳动物源的P450scc系统定位于线粒体，由P450酶、

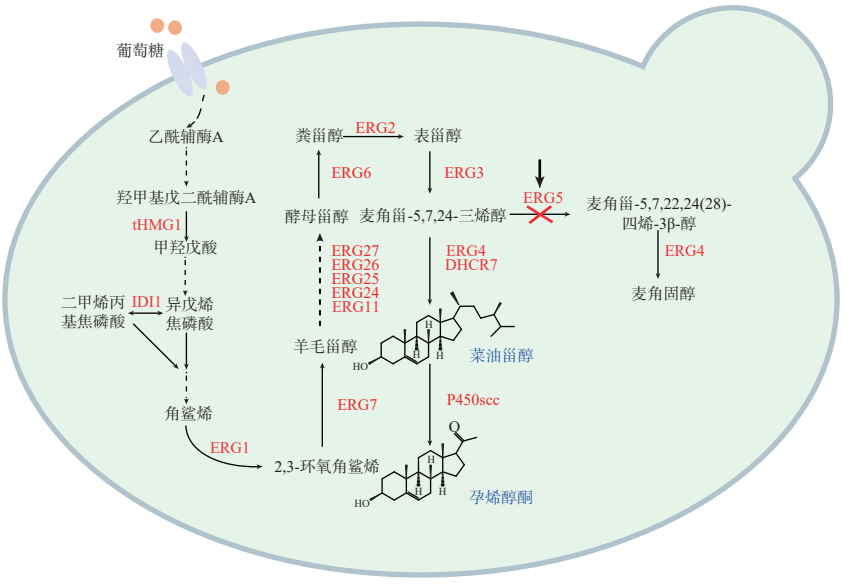


图1 酿酒酵母中孕烯醇酮合成途径

Fig. 1 Pregnenolone synthesis pathway in *S. cerevisiae*

铁氧还原蛋白还原酶（ADR）和铁氧还原蛋白（ADX）3种蛋白组成；而植物来源的P450scc系统定位于内质网，仅含有P450酶和NADPH依赖型P450还原酶（CPR）两种蛋白[8]。

与原核生物相比，真核宿主（如酿酒酵母）具备完整的甲羟戊酸途径、适配真核来源细胞色素P450酶的细胞膜体系，以及较为完善的翻译后修饰机制和良好的代谢工程改造潜力，已成为实现孕烯醇酮从头合成的重要微生物细胞工厂[9-11]。1998年，Duport等[12]通过引入牛源（*Bos taurus*）的CYP11A1、ADX和ADR，首次在酿酒酵母中实现了孕烯醇酮的从头合成。2023年，Carroll等[13]挖掘并在酿酒酵母中表达了来源于洋地黄（*Digitalis lanata*）的细胞色素P450酶CYP87A4及来源于拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）的氧化还原伴侣ATR1，首次将植物源的P450scc系统用于孕烯醇酮的从头合成。2025年，梅世豪等[14]以酿酒酵母为底盘细胞，组合短尾猫（*Lynx rufus*）来源的CYP11A1和解脂耶氏酵母（*Yarrowia lipolytica*）来源的ADR、ADX，在5 L发酵罐中将孕烯醇酮的产量提高至116.43 mg/L。尽管在酵母中已成功实现了孕烯醇酮的从头合成并取得了一定的进展，但其产量普遍较低，仍受多重因素制约，主要包括：酿酒酵母内源甾醇代谢网络复杂，存在竞争通路与调控限制；外源引入的P450酶与其氧化还原伴侣之间适配性不足；以及P450scc系统催化活性较低等问题。

基于此，本研究以实验室前期构建的高产菜油甾醇的酿酒酵母CY03为底盘菌株，通过引入外源P450scc系统，构建从葡萄糖到孕烯醇酮的完整生物合成途径。在此基础上，系统比较不同动物源和植物源的P450scc系统在酿酒酵母中的催化性能，筛选获得适配性更优的酶组合；进一步通过rDNA位点实现P450scc系统的多拷贝整合，以提高关键酶的表达水平；同时尝试采用蛋白融合工程提高电子传递效率，并结合培养基优化，提升重组菌株的整体发酵性能，为孕烯醇酮及其下游甾体化合物的绿色生物制造提供可行策略。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株、质粒及引物　本文所用的所有质粒通过测序验证，菌株和质粒见附表1，所使用的引物见附表2。

1.1.2　试剂　2×Phanta Max Master Mix、ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit V3、质粒小提试剂盒、凝胶回收试剂盒，南京诺唯赞生物科技股份有限公司；DNA Marker，TaKaRa公司；酵母粉、胰蛋白胨，英国Oxoid公司；蛋白胨、5-FOA（5-氟乳清酸）、PEG4000，生工生物工程（上海）股份有限公司；琼脂粉，赛国生物科技有限公司；YNB（无氨基酸酵母氮源）、ssDNA（鲑鱼精DNA），牛肉粉，北京索莱宝科技有限公司；乙酸锂二水合物，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；菜油甾醇标品、孕烯醇酮标品，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；其他试剂均为分析纯，国药化学试剂有限公司。

1.1.3　培养基　LB培养基：10 g/L氯化钠，10 g/L蛋白胨，5 g/L酵母粉。固体培养基加入2%的琼脂粉。121 ℃灭菌20 min。必要时添加氨苄抗生素，终浓度为100 μg/mL。

YPD培养基：20 g/L葡萄糖，20 g/L蛋白胨，10 g/L酵母粉。固体培养基加入2%的琼脂粉。115 ℃灭菌30 min。

SD培养基：20 g/L葡萄糖，6.7 g/L酵母氮源，可按需要添加10 mL/L 100×尿嘧啶（Ura）母液，10 mL/L 100×组氨酸（His）母液，10 mL/L 100×亮氨酸（Leu）母液，10 mL/L 100×色氨酸（Trp）母液。固体培养基加入2%的琼脂粉。115 ℃灭菌30 min。其中SD-Leu培养基：在SD培养基基础上添加10 mL/L 100×尿嘧啶（Ura）母液，10 mL/L 100×组氨酸（His）母液，10 mL/L 100×色氨酸（Trp）母液。

1.1.4　主要仪器与设备　超净工作台，苏净集团安泰公司；PCR仪，美国Bio-Rad公司；恒温金属浴，杭州奥盛仪器公司；生化培养箱，上海跃进医疗器械厂；HYL-C3组合式摇床，太仓市强乐实验设备有限公司；1260 Infinity II液相色谱系统，美国安捷伦科技公司；紫外分光光度计，上海翱艺仪器；数字式涡旋振荡器，奥然科学技术有限公司；NanoDrop 2000分光光度计，赛默飞世尔科技（中国）有限公司。

1.2　方法

1.2.1　质粒及菌株构建　目的基因由天霖生物科技

（无锡）有限公司根据酿酒酵母密码子优化后进行基因合成，以附表2中的引物对目的基因及pESC-Leu质粒进行PCR反应，扩增得到带有同源臂的目的基因片段及线性化载体，产物使用胶回收试剂盒回收。对线性化的pESC-Leu载体及目的基因片段进行同源重组连接后转入*E. coli* JM109感受态，挑取LB平板上单菌落进行菌落PCR和测序验证。验证无误后挑选单菌落接种于10 mL LB培养基中，使用质粒小量制备试剂盒提取重组质粒。通过PCR反应扩增获得目的片段，包括目的基因表达盒片段（启动子、目的基因、终止子），以及基因整合位点上下游500–1 000 bp同源臂序列和用于筛选的氨基酸片段（Leu/Ura/Trp/His）；各目的片段间存在20–40 bp的同源臂，通过化学转化的方式将各DNA片段共转化至酵母细胞中，通过同源重组整合至酿酒酵母基因组中。

1.2.2 酿酒酵母细胞感受态的制备和转化 挑取酿酒酵母单菌落于10 mL YPD培养基中过夜培养；吸取1 mL菌液转移到1.5 mL离心管中，6 000 r/min离心1 min，弃去培养基；使用1 mL无菌水清洗细胞，6 000 r/min离心1 min，弃上清，重复清洗两遍；使用1 mL 0.1 mol/L LiAc重悬细胞，4 ℃静置10 min，4 000 r/min离心5 min，弃去900 μL上清，剩余100 μL混匀重悬菌体；将50%(w/v) PEG4000 480 μL；1 mol/L LiAc 72 μL；10%单链ssDNA 40 μL；共转化的片段混合物28 μL；按照以上顺序，分别加入置于冰上的LiAc-细胞混合液内，高速涡旋1 min，使其充分混匀；将转化体系于30 ℃培养箱内静置30 min；加入72 μL二甲基亚砜（DMSO）轻柔混匀；42 ℃热激30 min，4 000 r/min离心1 min，弃上清，加入100 μL的5 mmol/L $CaCl_2$混匀重悬菌体，静置5–10 min，涂布于营养缺陷型平板。30 ℃培养箱中培养2–4 d，挑取单菌落进行菌落PCR和测序验证。

1.2.3 重组酵母菌株的发酵培养 在10 mL YPD培养基中接种平板上活化得到的单克隆重组菌株，于30 ℃，220 r/min培养24 h至OD_{600}约为5–6；然后以初始OD_{600}为0.2转接至50 mL YPD培养基中，在同等培养条件下连续发酵120 h。

1.2.4 孕烯醇酮的提取与检测 取10 mL发酵培养液于10 mL离心管中，8 000 r/min离心5 min，弃上清，将菌体转移至2 mL EP管，加入800 μL含20%氢氧化钾的50%乙醇溶液，在涡旋振荡器中2 700 r/min震荡5 min，于80 ℃的金属浴中进行皂化4 h，反应结束后，待其自然冷却至室温，加入800 μL的正己烷于涡旋振荡器中2 700 r/min振荡20 min，再将反应液于8 000 r/min离心5 min，取上层有机相过0.22 μm有机滤膜后经高效液相色谱仪进行分析。

高效液相色谱仪为Agilent 1260，色谱柱为Agilent 5 TC-C18（4.6 mm×250 mm，5 μm）。孕烯醇酮的检测条件：流动相为乙腈∶水（v∶v）=70%∶30%，柱温为30 ℃，流速为1.0 mL/min，检测波长为203 nm，单次进样量为20 μL。

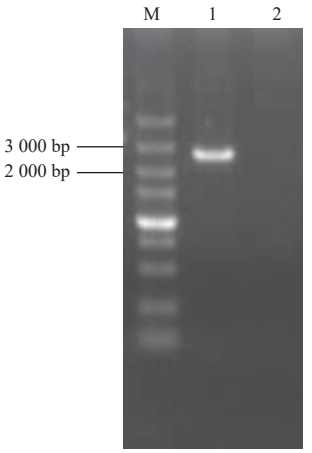
孕烯醇酮标准品的配置：称取10 mg孕烯醇酮，溶于10 mL 100%的甲醇作为孕烯醇酮母液。将此浓度的孕烯醇酮母液依次用100%的甲醇稀释成5、10、20、50、100 mg/L，通过0.22 μm有机系滤膜过滤，使用安捷伦高效液相色谱仪检测。

1.2.5 RNA提取和实时荧光定量PCR分析 挑取单菌落接入10 mL YPD培养基中，30 ℃，220 r/min培养72 h后，取1 mL菌液离心弃上清，加入200 μL ddH_2O悬浮细胞并加入3 μL溶壁酶轻柔混匀，于30 ℃条件下破壁处理1 h。然后根据RNA提取试剂盒提取酵母RNA。将已提取好的mRNA反转录成cDNA，再将cDNA的浓度稀释至20 ng/μL作为模板，利用SYBR®GreenI试剂进行Real-time PCR，内参基因选择*ACT1*。

2 结果

2.1 孕烯醇酮合成途径的构建

为构建高效合成孕烯醇酮的重组菌株，本研究以实验室前期构建的高产菜油甾醇的酿酒酵母菌株CY03作为出发菌株，其菜油甾醇产量可达625.6 mg/L，其中游离菜油甾醇含量为70.6 mg/L。选择家牛（*Bos taurus*）来源的P450scc系统作为催化模块，包括细胞色素P450酶CYP11A1及其氧化还原伴侣ADX和ADR。利用酿酒酵母的同源重组机制，将P_{GAL1}-*CYP11A1*-P_{GAL1}-*ADX*-P_{GAL10}-*ADR*表达盒整合至酿酒酵母基因组的*ARS1114*位点。菌落PCR结果如图2所示，与对照相比，重组菌株的PCR产物在2 000–3 000 bp处存在明显单一条带，与正确条带大小（2 584 bp）一致。将条带大小正确的单菌落进一步测序验证，结果显示P450scc系统已成功整合至基因



M：DNA marker；1：重组菌株CE01；2：对照菌株CY03

M: DNA marker; 1: recombinant strain CE01; 2: control strain CY03

图2　重组菌株CE01的验证

Fig. 2　Identification of strain CE01

组中，重组菌株CE01构建完成。

对菌株的发酵产物分别进行HPLC和LC-MS检测。HPLC检测结果（图3-A–C）显示，重组菌株CE01发酵样品中出现与孕烯醇酮标准品保留时间一致的色谱峰（RT=7.5 min），而对照菌株CY03发酵样品在相同保留时间处未见该峰。质谱检测结果（图3-D–E）显示，样品与标准品的主要特征峰基本一致，均检测到分子离子峰*m/z* 317［M+H］$^+$及其关键碎片离子（*m/z* 299、*m/z* 281），且碎片离子的相对丰度比与标准品一致。上述结果表明，整合P450scc系统的酿酒酵母重组菌株CE01能够有效催化菜油甾醇生成孕烯醇酮，其产量为302 μg/L。

2.2　不同来源的P450scc组分的筛选

为提高P450scc系统各组分之间的适配性，选取文献报道催化效果较好的多种来源酶元件进行组合配对，包括动物源的牛（*Bos taurus*）、野猪（*Sus scrofa*）和人（*Homo sapiens*）来源的CYP11A1、ADX和ADR，以及植物源的洋地黄（*Digitalis lanata*）来源的CYP87A4和拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）来源的ATR1。将不同组合的P450scc系统分别整合至酿酒酵母基因组的*ARS1114*位点（图4-A），最终构建了7株酿酒酵母重组菌株CE01–CE07。在摇瓶水平对上述重组菌株进行发酵验证，结果如图4-B所示。7种不同组合的重组菌株均能够检测到孕烯醇酮的生成，其中，菌株CE07（含有洋地黄来源的CYP87A4与拟南芥来源的ATR1）表现出最高的孕烯醇酮产量，达到3.75 mg/L。

2.3　P450scc系统的多拷贝整合

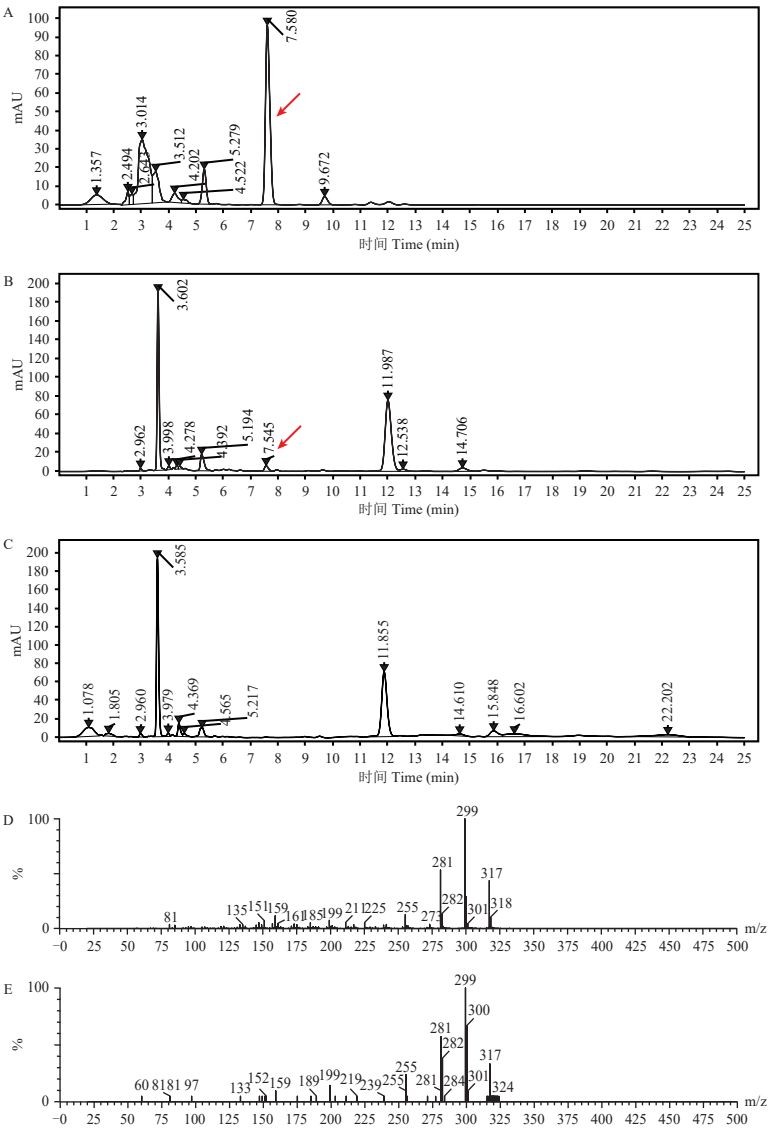
为进一步提高P450scc系统的表达水平，利用酵母基因组中的rDNA位点实现P450scc系统的多拷贝整合（图5-A）。通过PCR扩增rDNA位点上下游500–1 000 bp的同源臂、P_{GAL1}-*CYP87A4*-P_{GAL10}-*ATR1*表达盒以及Leu营养缺陷型标签，将上述片段共转化至菌株CY03中，获得8株阳性转化子。对获得的重组菌株进行摇瓶水平发酵验证，结果如图5-B所示。与对照菌株相比，重组菌株CE08-8的孕烯醇酮产量显著提高，达到14.51 mg/L，较对照提升3.87倍。为进一步验证多拷贝整合效果，采用实时荧光定量PCR（RT-qPCR）对菌株CE08-8与CE07中CYP87A4的转录水平进行分析，结果如图5-C所示，CE08-8中CYP87A4的转录水平显著高于CE07。进一步测定表明，重组菌株CE08-8中P450scc系统的拷贝数约为5。

2.4　P450scc系统的蛋白融合

为提高CYP87A4与其氧化还原伴侣ATR1之间的电子传递效率，尝试采用蛋白融合策略以缩短两者之间的物理距离，并考察不同长度连接肽及融合顺序对孕烯醇酮合成的影响。分别构建表达盒P_{GAL1}-*CYP87A4*-$(GGGGS)_2$-*ATR1*、P_{GAL1}-*ATR1*-$(GGGGS)_2$-*CYP87A4*、P_{GAL1}-*CYP87A4*-$(GGGGS)_3$-*ATR1*以及P_{GAL1}-*ATR1*-$(GGGGS)_3$-*CYP87A4*，并将其整合至酿酒酵母CY03的基因组中，获得重组菌株CE09–CE12（图6-A）。对上述重组菌株进行摇瓶水平发酵验证，结果如图6-B所示。与对照菌株相比，CE09–CE12中孕烯醇酮的产量均有所下降，说明通过蛋白linker连接CYP87A4与ATR1并未有效提高孕烯醇酮的合成水平。

2.5　发酵培养基的单因素优化

2.5.1　发酵培养基的碳源优化　为获得孕烯醇酮生产的最佳碳源，探究了不同碳源种类（葡萄糖、果糖、蔗糖、木糖、乳糖和麦芽糖）对菌株生长及孕烯醇酮产量的影响。各碳源的初始添加浓度为20 g/L，发酵结果如图7-A所示，以木糖和乳糖为碳源时，菌体几乎不生长，且未检测到孕烯醇酮生



A：孕烯醇酮标准品的HPLC图；B：重组菌株CE01发酵样品的HPLC图；C：对照菌株CY03发酵样品的HPLC图；D：孕烯醇酮标准品的MS图；E：重组菌株CE01发酵样品的MS图

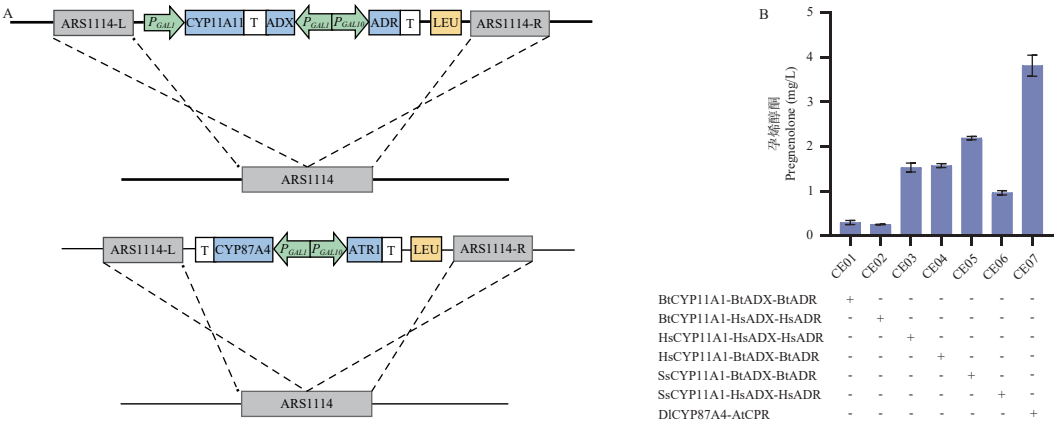
A: HPLC chromatogram of the pregnenolone standard; B: HPLC chromatogram of the fermentation sample from the recombinant strain CE01; C: HPLC chromatogram of the fermentation sample from the control strain CY03; D: MS spectrum of the pregnenolone standard; E: MS spectrum of the fermentation sample from the recombinant strain CE01

图3 重组菌株发酵产物的结构鉴定

Fig. 3 Structural identification of the fermentation products of the recombinant strains

成；以葡萄糖和果糖为碳源时，孕烯醇酮产量较高且相近，其中以果糖为碳源时菌体生长状况最好。进一步计算以葡萄糖和果糖为碳源时的单位菌体孕烯醇酮产量，结果表明，以果糖为碳源时单位菌体产量为1.08 mg/L/OD_{600}，而以葡萄糖为碳源时为1.23 mg/L/OD_{600}。综合单位菌体产量及原料成本等因素，选择葡萄糖作为后续实验的最佳碳源。

在确定葡萄糖为最佳碳源后，设置其初始浓度为10、20、30、40和50 g/L进行下一步优化。发酵结果如图7-B所示，当葡萄糖浓度为20 g/L时，菌体生长水平（OD_{600}）和孕烯醇酮产量均达到最高；随着葡萄糖浓度的进一步提高，菌体生长受到抑制，孕烯醇酮产量亦随之下降。因此，确定20 g/L为葡萄糖的最适添加浓度。

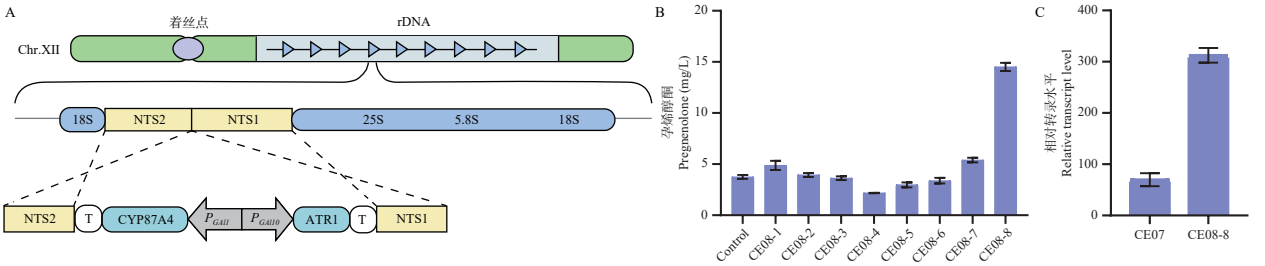


A：基因表达盒整合示意图；B：不同来源P450scc系统组合配对的孕烯醇酮产量

A: Diagram of gene expression cassette integration; B: the production of pregnenolone in different combinations of P450scc systems from different sources

图4　不同来源的P450scc系统的组合对孕烯醇酮产量的影响

Fig. 4　Effect of combined of P450scc systems from different sources on the production of pregnenolone

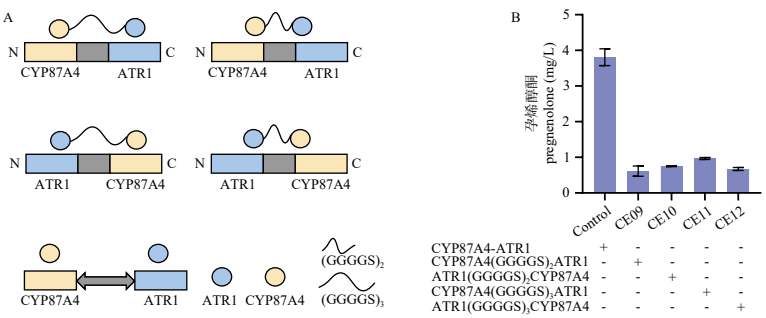


A：rDNA位点多拷贝整合示意图；B：多拷贝整合P450scc系统的孕烯醇酮产量；C：CYP87A4的相对转录水平

A: Diagram of multi-copy integration of rDNA; B: the production of pregnenolone in the multi-copy integrated P450scc system; C: the relative transcriptional level of CYP87A4

图5　rDNA位点多拷贝整合P450scc系统对孕烯醇酮产量的影响

Fig. 5　Effect of multi-copy integration of rDNA sites on the P450scc system on the production of pregnenolone



A：CYP87A4与ATR1蛋白融合示意图；B：蛋白融合孕烯醇酮的产量

A: Diagram of the fusion of CYP87A4 with ATR1 protein; B: production of pregnenolone in the protein fusion strain

图6　蛋白融合工程对孕烯醇酮生产的影响

Fig. 6　Effect of protein fusion engineering on the production of pregnenolone

2.5.2　发酵培养基的氮源优化　在优化碳源的基础上，进一步考察了不同氮源对菌株生长及孕烯醇酮产量的影响，选用组合氮源1（酵母粉：蛋白胨，1∶2）、组合氮源2（酵母粉：胰蛋白胨，1∶2），单

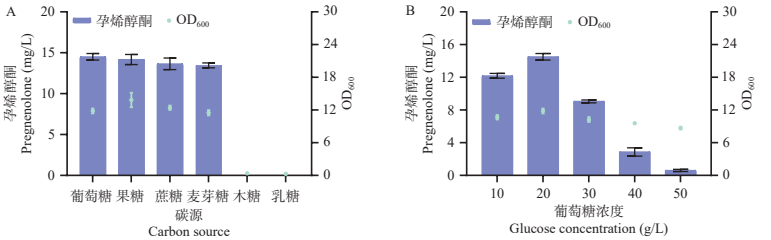


图7 碳源种类(A)和浓度(B)对孕烯醇酮合成的影响

Fig. 7 Effect of carbon sources types (A) and concentration (B) on the production of pregnenolone

一氮源酵母粉、蛋白胨、牛肉粉、玉米浆进行培养基氮源种类的优化，氮源的添加浓度为30 g/L。发酵结果如图8-A所示，以酵母粉为氮源时，菌体生长状况最好，以组合氮源1为氮源时，孕烯醇酮产量最高，故选择组合氮源1（酵母粉：蛋白胨，1：2）为最佳氮源并进行浓度优化。

在确定组合氮源1为最佳氮源后，设置其初始浓度为10、20、30、40和50 g/L进行下一步优化。发酵结果如图8-B所示，菌体OD_{600}随着氮源浓度的增加而上升，当氮源浓度为30 g/L时，孕烯醇酮产量最高，随着浓度的继续增加，孕烯醇酮的产量未有显著变化，故选择30 g/L为组合氮源1的最适浓度。

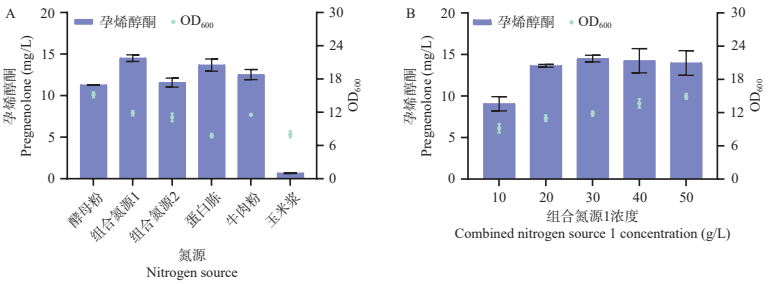


图8 氮源种类(A)和浓度(B)对孕烯醇酮合成的影响

Fig. 8 Effect of nitrogen sources types (A) and concentration (B) on the production of pregnenolone

2.5.3 发酵培养基的金属离子优化 在前期碳、氮源优化的基础上，进一步考察了不同金属离子Cu^{2+}、Ca^{2+}、Na^{+}、K^{+}、Mg^{2+}、Fe^{3+}对菌株生长及孕烯醇酮产量的影响，金属离子的添加浓度设置为0.2 g/L，发酵结果如图9-A所示，添加Cu^{2+}对孕烯醇酮的合成有明显的抑制作用，添加K^{+}对菌体生长有促进作用，且有效提升孕烯醇酮的合成，故选择K^{+}为最适金属离子（无机盐）。

在确定添加K^{+}对重组菌株生成孕烯醇酮有促进作用后，设置其初始浓度为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/L进行下一步优化，发酵如图9-B所示，K^{+}浓度为0.3 g/L时，孕烯醇酮的产量达到最高，随着K^{+}浓度的继续增加，孕烯醇酮的产量有所下降，故选择0.3 g/L为K^{+}的最适添加浓度。

综上结果所述，最佳培养基为：20 g/L葡萄糖、10 g/L酵母粉、20 g/L蛋白胨，并在此基础上添加0.3 g/L K^{+}，重组菌株CE08-8从头合成孕烯醇酮的产量达到16.82 mg/L，较培养基优化前（14.51 mg/L）提高了15.92%。

3 讨论

在酿酒酵母从头合成孕烯醇酮的代谢途径中，菜油甾醇是直接前体物质，其含量直接影响孕烯醇酮的合成[15]。因此，本研究以实验室前期构建的高产菜油甾醇的酿酒酵母菌株CY03为出发菌株，通过引入外源P450scc系统，成功构建了从葡萄糖到孕烯醇酮的完整代谢途径。整合牛源P450scc系统（CYP11A1、ADX和ADR）后获得的重组菌株CE01，经发酵验证孕烯醇酮产量为302 μg/L。该结果表明

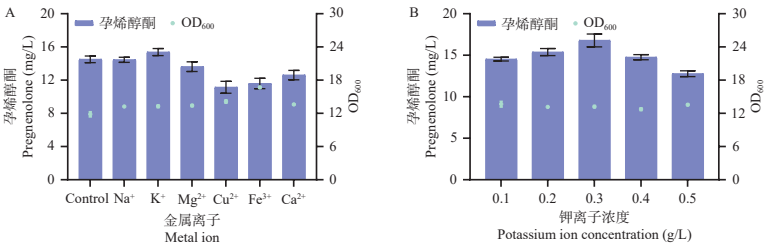


图9　金属离子种类(A)及浓度(B)对孕烯醇酮合成的影响

Fig. 9　Effect of metal ions types (A) and concentrations (B) on the production of pregnenolone

P450scc系统能够在酿酒酵母中实现功能性表达。不同物种来源的P450scc系统在氨基酸序列、结构特征和催化性能上存在显著差异[14-15]。通过对不同来源P450scc系统进行组合配对，发现洋地黄来源的CYP87A4与拟南芥来源的ATR1组合构建的重组菌CE07表现出最佳的催化性能，孕烯醇酮产量达到3.75 mg/L，显著高于哺乳动物源的P450scc系统。已有研究表明，菜油甾醇在酿酒酵母中的合成主要发生于内质网，其中大部分经甾醇酰基转移酶（ARE1/ARE2）催化形成甾醇酯并储存于脂质体疏水核心，仅有少量以游离形式存在[16]。植物来源的P450scc系统同样定位于内质网，而哺乳动物来源的P450scc系统定位于线粒体，需将菜油甾醇从内质网转运至线粒体后方可完成催化反应[17]。由于植物来源的P450scc系统与底物菜油甾醇合成场所高度重合，避免了复杂的跨膜转运过程，从而在酿酒酵母中表现出更高的催化效率。

酿酒酵母的核糖体DNA（rDNA）位点是位于第十二号染色体上的高度串联重复序列，由约100-200个串联重复的rDNA单元组成，每个单元包含35S rRNA、5S rRNA基因及非转录间隔区（NTS）[18]。利用同源重组技术，可将外源基因定向整合至rDNA重复单元中，从而获得稳定遗传的多拷贝表达。基于rDNA多拷贝位点的基因组整合策略已经被广泛应用于工程酵母中甾体化合物的合成。曲丽莎[19]通过*Ty1*位点增加DHCR24拷贝数，7-脱氢胆固醇产量提升120%。Qin等[20]在酿酒酵母*Ty2*位点实现关键酶DHCR7的多拷贝整合，菜油甾醇的产量提升78.6%。本研究采用rDNA位点实现P450scc系统的多拷贝整合，多拷贝整合菌株CE08-8的孕烯醇酮产量提升至14.51 mg/L，较单拷贝菌株提高约3.87倍。该结果表明，多拷贝整合策略能够有效提高外源P450scc系统的表达水平，从而提高孕烯醇酮的产量。

CPR作为细胞色素P450酶的电子供体，在催化循环中起着关键作用，理论上缩短P450酶与CPR之间的物理距离有助于提高电子传递效率[21]。然而，本研究中CYP87A4与ATR1的蛋白融合反而导致孕烯醇酮产量下降。推测其原因可能在于天然状态下CYP87A4与ATR1能够通过动态、瞬时的相互作用完成电子传递，而融合蛋白限制了二者的构象灵活性，使其固定于非最优空间构型，从而抑制了催化活性[22]。

培养基成分是影响酿酒酵母发酵性能的重要因素。其中，碳源直接调控着菌体生长、代谢通量分配及目标产物合成效率[23-24]；氮源则与碳源协同作用，维持代谢平衡并促进产物积累[25]；金属离子（无机盐）作为微生物发酵所必需的辅助因子，在酶激活、结构稳定、信号传导及氧化还原反应中发挥重要作用[26-27]。本研究对重组菌株的培养基成分进行了优化，结果显示葡萄糖为最适碳源，而以木糖或乳糖作为碳源时菌体几乎不生长，这是由于酿酒酵母缺乏高效的木糖转运系统和木糖代谢途径，几乎无法利用木糖生长；同时由于缺乏β-半乳糖苷酶和乳糖透酶等关键酶，也不能利用乳糖[28-29]。葡萄糖的最适浓度为20 g/L，随着浓度的进一步提高，菌体OD_{600}与孕烯醇酮产量均出现下降，这可能是由于在高浓度的葡萄糖下，克拉伯效应（Crabtree）增强，糖酵解通量剧增，乙醇过量积累，使得细胞能量利用效率下降，碳流更多流向乙醇而非目标代谢通路，且乙醇对细胞生长和代谢具有一定的毒性[30]；氮源优化结果显示，当酵母粉和蛋白胨浓度满足菌体生长需求后，其变化对孕烯

醇酮合成影响不显著，说明氮源并非限制性因素。此外，在培养基中添加0.3 g/L钾离子（K^+）能显著促进孕烯醇酮合成，可能与其维持细胞内离子稳态、增强代谢活性有关[31]。在优化培养基条件下（20 g/L葡萄糖、10 g/L酵母粉、20 g/L蛋白胨和0.3 g/L钾离子），孕烯醇酮产量提升至16.82 mg/L，较优化前提高15.92%，表明发酵培养基成分对孕烯醇酮合成具有重要影响。

尽管本研究已实现了孕烯醇酮在酿酒酵母中的从头合成，但仍存在进一步的优化空间。后续研究可通过调控甾醇的酯化与水解过程，提高游离菜油甾醇的含量以增加前体供应[32]。其次，P450scc系统的催化效率仍是孕烯醇酮合成的主要限制因素，可通过定向进化或酶工程手段提升其催化活性与底物特异性[33]。此外，利用葡萄糖从头合成孕烯醇酮需要消耗大量的NADPH，胞内NADPH/$NADP^+$比例也影响着P450scc系统的催化效率，因此可通过过表达磷酸戊糖途径关键基因（如*ZWF1*和*GND1*）或引入外源辅因子再生系统（如NOX酶）来增强NADPH供应[34]。

4 结论

以实验室前期构建的高产菜油甾醇的酿酒酵母为底盘菌株，构建了从葡萄糖到孕烯醇酮的从头合成途径。通过筛选不同来源的P450scc系统、增加P450scc系统的拷贝数及对P450scc系统进行蛋白融合等策略，有效提升了重组菌株孕烯醇酮的产量。通过系统的发酵培养基优化，重组菌株CE08-8孕烯醇酮产量达到16.82 mg/L。

文章所有附图附表请点击链接查看（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260429170105_NewsFile_34.pdf）。

参考文献

[1] Wang Y, Gui JH. Recent advances in the efficient synthesis of steroid natural products: emerging methods and strategies [J]. Chem Soc Rev, 2025, 54(14): 6807-6831.

[2] Chen GH, Li CN, Kou BW, et al. Recent advances in the biosynthesis enzymes of steroidal natural products [J]. Sci Sin-Vitae, 2025, 55(10): 2061-2079.

[3] Chen H, Wang YS, Zhang Y, et al. Reengineering of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* and its sustainable application in *Citrus peel* processing industry [J]. New Biotechnol, 2025, 90: 155-162.

[4] 张羽. 菜油甾醇和孕烯醇酮在耶氏解脂酵母中的合成与优化 [D]. 天津: 天津大学, 2017.
Zhang Y. *De novo* synthesis and optimization of campesterol and pregnenolone in *Yarrowia lipolytica* [D]. Tianjin: Tianjin University, 2017.

[5] Mendoza Lara DF, Hernández-Caballero ME, Terán JL, et al. Anticancer activities of natural and synthetic steroids: a review [J]. ACS Omega, 2025, 10(8): 7493-7509.

[6] Ting TY, Li YD, Bunawan H, et al. Current advancements in systems and synthetic biology studies of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Biosci Bioeng, 2023, 135(4): 259-265.

[7] Zhang RS, Zhang Y, Wang Y, et al. Pregnenolone overproduction in *Yarrowia lipolytica* by integrative components pairing of the cytochrome P450scc system [J]. ACS Synth Biol, 2019, 8(12): 2666-2678.

[8] Jiang LH, Huang L, Cai J, et al. Functional expression of eukaryotic cytochrome P450s in yeast [J]. Biotech & Bioengineering, 2021, 118(3): 1050-1065.

[9] Xu SJ, Meng J, Zhang Q, et al. CILF: CRISPR/Cas9 based integration of large DNA fragments in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotech & Bioengineering, 2024, 121(12): 3906-3911.

[10] Mauersberger S, Novikova LA, Shkumatov VM. Cytochrome P450 expression in *Yarrowia lipolytica* and its use in steroid biotransformation [M]//Barth G. Yarrowia lipolytica: Biotechnological Applications. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013: 171-226.

[11] Xie YF, Fan CX, Piao MH, et al. Enhanced ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* via rational multigenetic modification and two-stage fermentation [J]. Process Biochem, 2026, 161: 18-25.

[12] Duport C, Spagnoli R, Degryse E, et al. Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast [J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(2): 186-189.

[13] Carroll E, Ravi Gopal B, Raghavan I, et al. A cytochrome P450 CYP87A4 imparts sterol side-chain cleavage in digoxin biosynthesis[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 4042.

[14] 梅世豪, 张嵩林, 邵明龙, 等. 酿酒酵母高效合成孕烯醇酮细胞工厂的构建 [J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(17): 11-19.
Mei SH, Zhang SL, Shao ML, et al. Construction of a cell factory for efficient pregnenolone synthesis by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Food Ferment Ind, 2025, 51(17): 11-19.

[15] Liu W, Dong XF, Li HB, et al. Rewiring metabolism and restoring sterol homeostasis for overproduction of campesterol in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Chem Eng J, 2025, 515: 163686.

[16] Jiang YQ, Sun ZJ, Lu KX, et al. Manipulation of sterol homeostasis for the production of 24-epi-ergosterol in industrial yeast [J]. Nat

Commun, 2023, 14: 437.

[17] Li RS, Guo S, Wang D, et al. Elucidation of the plant progesterone biosynthetic pathway and its application in a yeast cell factory [J]. Metab Eng, 2025, 90: 197-208.

[18] Zheng HH, Wang K, Xu XX, et al. Highly efficient *rDNA*-mediated multicopy integration based on the dynamic balance of rDNA in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Microb Biotechnol, 2022, 15(5): 1511-1524.

[19] 曲丽莎. 利用代谢工程改造酿酒酵母高效合成7-脱氢胆固醇 [D]. 无锡: 江南大学, 2022.
Qu LS. Engineered yeast for efficient *de novo* synthesis of 7-dehydrocholesterol [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.

[20] Qin ZJ, Zhang YL, Liu S, et al. Combining metabolic engineering and lipid droplet assembly to achieve campesterol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Agric Food Chem, 2024, 72(9): 4814-4824.

[21] Qu GY, Song YF, Xu XH, et al. *De novo* biosynthesis of mogroside V by multiplexed engineered yeasts [J]. Metab Eng, 2025, 88: 160-171.

[22] Wang YY, Sun MC, Shen XL, et al. Engineering the cytochrome P450 oxidation system to enhance benzyl glucosinolate production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Agric Food Chem, 2025, 73(38): 24286-24294.

[23] Garcia-Albornoz M, Holman SW, Antonisse T, et al. A proteome-integrated, carbon source dependent genetic regulatory network in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Mol Omics, 2020, 16(1): 59-72.

[24] Lu XC, Chang MX, Li XY, et al. Metabolic engineering for sustainable xylitol production from diverse carbon sources in *Pichia pastoris* [J]. Microb Cell Fact, 2025, 24: 59.

[25] Wang YH, Zhu HX, Pan SY, et al. Effect of different nitrogen source and *Saccharomyces cerevisiae* strain on volatile sulfur compounds and their sensory effects in chardonnay wine [J]. Food Chem X, 2024, 24: 101793.

[26] Chen Y, Li FR, Mao JW, et al. Yeast optimizes metal utilization based on metabolic network and enzyme kinetics [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(12): e2020154118.

[27] Cheng YT, Luo LL, Tang H, et al. Engineering the microenvironment of P450s to enhance the production of diterpenoids in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Acta Pharm Sin B, 2024, 14(10): 4608-4618.

[28] Tanaka K, Yukawa T, Bamba T, et al. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for growth on xylose using an oxidative pathway [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2025, 109: 30.

[29] Zou J, Chen XH, Hu YH, et al. Uncoupling glucose sensing from GAL metabolism for heterologous lactose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotechnol Lett, 2021, 43(8): 1607-1616.

[30] Guo BY, Li YY, Liu YJ, et al. Reprogramming carbon flux to eliminate crabtree effect-associated ethanol production for high-yieldl-lactic acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Agric Food Chem, 2025, 73(49): 31274-31285.

[31] Kukovetz K, Cartolano M, Gebhardt M, et al. Yeast complementation assays provide limited information on functional features of K^+ channels [J]. Biophys Rep, 2025, 5(2): 100206.

[32] Petrisková L, Kodedová M, Balážová M, et al. Lipid droplets control the negative effect of non-yeast sterols in membranes of *Saccharomyces cerevisiae* under hypoxic stress [J]. BBA Mol Cell Biol Lipds, 2024, 1869(7): 159523.

[33] Chen QH, Wei WQ, Chao ZK, et al. Electron transfer engineering of artificially designed cell factory for complete biosynthesis of steroids [J]. Nat Commun, 2025, 16: 3740.

[34] Zhu Y, Yan XG, Li WG, et al. Cofactor-coupled cytochrome P450 engineering enables high-level biosynthesis of Asiatic acid in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Bioresour Technol, 2026, 441: 133558.

（责任编辑　朱琳峰）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):328-338

猪δ冠状病毒核衣壳蛋白稳转细胞株的构建及其功能探究

杨泰然[1, 2, 3, 4] 郑鑫祺[1, 2, 3, 4] 胡超[2, 3, 4, 5] 安婷婷[2, 3, 4, 5] 文龙[2, 3, 4, 5]
李有利[2, 3, 4, 5] 陈峥宏[2, 3, 5] 崔古贞[2, 3, 5] 李博岩[1*] 田益明[2, 3, 4, 5*]

（1.贵州医科大学公共卫生与健康学院,贵阳 550000；2.贵州医科大学基础医学院病原生物学系,贵阳 550000；3.贵州省普通高等学校病原生物学特色重点实验室,贵阳 550000；4.贵州医科大学-上海交通大学医学院病毒研究所,贵阳 550000；5.贵州省微生物组与感染性疾病防控全省重点实验室,贵阳 550000）

摘 要：【目的】构建稳定表达猪δ冠状病毒（porcine deltacoronavirus, PDCoV）核衣壳蛋白（N）的单克隆细胞株，为解析其在病毒生命周期中调控宿主细胞微环境促进病毒增殖的致病机制提供细胞工具。【方法】基于系统发育分析选取3个不同谱系PDCoV代表株，构建*N*基因慢病毒真核表达质粒；利用慢病毒系统及极限稀释法，获得稳定表达N蛋白的LLC-PK单克隆细胞株；通过干扰素-β（IFN-β）启动子荧光素酶报告系统、实时荧光定量PCR、流式细胞术及病毒增殖实验，分析N蛋白稳定表达对I型干扰素（IFN-I）通路、宿主细胞周期及病毒增殖能力的影响。【结果】成功构建了30株稳定表达PDCoV N蛋白的单克隆LLC-PK稳转细胞系，其中包括北美谱系人源毒株HT/h0256来源的12株、中国谱系人源毒株HT/h0329来源的9株，以及东南亚谱系毒株THA/S5011来源的9株。功能探究结果显示，PDCoV N蛋白的稳定表达可显著抑制仙台病毒（SeV）诱导的IFN-β启动子活性及下游干扰素刺激基因（*ISG*56、*ISG*15和*MX*1）的激活，并且该蛋白能显著诱导LLC-PK细胞发生S期阻滞。此外，N蛋白的稳定表达还可显著促进病毒在宿主细胞中的增殖。【结论】成功构建了表达3个谱系PDCoV代表株N蛋白的LLC-PK单克隆稳转细胞株，其中N蛋白的稳定表达可显著抑制IFN-I通路、诱导宿主细胞S期阻滞，并促进病毒增殖，为深入解析N蛋白调控宿主细胞微环境的致病机制提供了重要细胞模型。

关键词：猪δ冠状病毒；核衣壳蛋白；稳转细胞株；I型干扰素通路；S期阻滞；病毒复制

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1397

Construction and Functional Characterization of Stable Cell Lines Expressing Nucleocapsid Protein of Porcine Deltacoronavirus

YANG Tai-ran[1, 2, 3, 4] ZHENG Xin-qi[1, 2, 3, 4] HU Chao[2, 3, 4, 5] AN Ting-ting[2, 3, 4, 5] WEN Long[2, 3, 4, 5] LI You-li[2, 3, 4, 5]
CHEN Zheng-hong[2, 3, 5] CUI Gu-zhen[2, 3, 5] LI Bo-yan[1*] TIAN Yi-ming[2, 3, 4, 5*]

（1. *School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang* 550000; 2. *Department of Pathogen Biology, College of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang* 550000; 3. *Guizhou Provincial Distinguished Key Laboratory of Pathogen Biology for Higher Education Institutions, Guiyang* 550000; 4. *Guizhou Medical University & Shanghai Jiao Tong University School of Medicine Joint Institute of Virology, Guiyang* 550000; 5. *Guizhou Provincial Key Laboratory of Microbiome and Infectious Disease Prevention and Control, Guiyang* 550000）

Abstract: 【Objective】 This study aims to establish monoclonal cell lines stably expressing the nucleocapsid (N) protein of porcine deltacoronavirus (PDCoV), which will provide a cellular tool to elucidate its pathogenic mechanism in modulating the host cellular microenvironment to enhance viral proliferation in the viral life cycle. 【Method】 Three representative PDCoV strains from different lineages were selected based on phylogenetic analysis, and eukaryotic lentiviral expression plasmids carrying the *N* gene were constructed. The

收稿日期：2025-12-22
基金项目：国家自然科学基金项目（32260035，32460042），贵州省科技计划项目（黔科合基础-ZK［2023］一般333），贵州省中央引导地方科技发展资金项目（黔科合中引地［2025］024）
*通信作者：田益明 tianym@gmc.edu.cn，李博岩 boyan.li@gmc.edu.cn

lentiviral system combined with the limiting dilution method was then used to generate LLC-PK monoclonal cell lines stably expressing PDCoV N protein. Finally, the interferon-β (IFN-β) promoter luciferase reporter system, quantitative real-time PCR (RT-qPCR), flow cytometry, and viral proliferation assays were employed to analyze the effects of stable N protein expression on the type I interferon (IFN-I) pathway, host cell cycle, and viral proliferation ability. 【Result】 A total of 30 LLC-PK monoclonal cell lines stably expressing PDCoV N protein were successfully established, including 12 lines of the North American lineage (HT/h0256, a human-derived strain), 9 lines of the Chinese lineage (HT/h0329, a human-derived strain), and 9 lines of the Southeast Asian lineage (THA/S5011). Functional investigation revealed that the stable expression of PDCoV N protein significantly suppresses Sendai virus (SeV)-induced activation of the IFN-β promoter activity and the expression of downstream interferon-stimulated genes (*ISG56*, *ISG15* and *MX1*), induces pronounced S-phase arrest in LLC-PK cells, and markedly enhances viral proliferation within host cells. 【Conclusion】 Stable LLC-PK monoclonal cell lines expressing the N protein of representative strains across three PDCoV lineages were successfully established. The sustained expression of N protein in these cell lines effectively antagonizes the IFN-I signaling pathway, induces host cell S-phase arrest, and enhances viral proliferation, thereby providing a critical cellular model for further dissection of the pathogenic mechanisms underlying N protein-mediated modulation of the host cellular microenvironment.

Keywords: porcine deltacoronavirus; nucleocapsid protein; stable cell line; type I interferon pathway; S-phase arrest; virus replication

近20年来，3种动物源性冠状病毒（SARS-CoV、MERS-CoV和SARS-CoV-2）的跨物种“外溢”已对人类生命健康、社会经济稳定与国家安全造成严重危害[1-3]。新发人兽共患冠状病毒的跨物种感染与流行已成为全球重大公共卫生问题[4]。猪δ冠状病毒（porcine deltacoronavirus, PDCoV）是2012年发现的一种新型δ属肠道冠状病毒，基因组结构为5′ UTR-ORF1ab-S-E-M-NS6-N-NS7(NS7a)-3′ UTR，全长约25.4 kb[5]。该病毒可感染各日龄猪群，目前已成为北美、东亚、东南亚等地猪场腹泻疫情的主要病原之一[6-7]。该病毒基因型可分为北美谱系、中国谱系、中国早期谱系和东南亚谱系，这4个谱系毒株在我国均有流行[8-10]。后续研究发现PDCoV具有跨物种感染潜力，可体外感染人、牛和鸡等多宿主细胞，人工感染犊牛和禽类亦可引起轻度腹泻症状[11-13]。2021年，Lednicky等[14]从海地儿童血样中分离到人源PDCoV，其与猪源毒株高度同源，首次证实该病毒具备感染人的能力。然而，PDCoV在人群中的致病性及流行风险尚不明确，其跨物种感染能力提示该病毒存在引发新发疫情的风险。因此，解析PDCoV的生物学特性及其与宿主相互作用的致病机制，对于该病毒感染人的前瞻性防控具有重要意义。

冠状病毒致病性由病毒毒力因子、宿主免疫状态及环境因素共同决定，其中病毒编码的毒力蛋白是决定致病性的核心因素[15]。核衣壳蛋白（nucleocapsid protein, N）是冠状病毒粒子中含量最丰富的结构蛋白，其包含2个保守结构域：N端结构域（NTD）和C端结构域（CTD），两者由富含丝氨酸/精氨酸（SR）的无序区域（IDR）连接。这3个结构域均具备RNA结合与二聚化能力，对病毒生命周期的多个环节至关重要[16]。例如，在感染后期，N蛋白与病毒RNA结合形成核衣壳，可维持病毒基因组的稳定性，进而保障其复制与传递的可靠性[17]。除上述结构性功能外，N蛋白在病毒致病过程中亦发挥关键作用。研究表明，N蛋白可通过多种机制干扰宿主抗病毒免疫，例如抑制I型干扰素（IFN-I）通路、影响应激颗粒形成、调控细胞周期进程及细胞凋亡等，从而削弱宿主的固有免疫防线，重塑宿主细胞生理状态，为病毒复制创造有利条件[18-19]。近期研究发现，N蛋白可作为连接病毒复制与免疫病理损伤的枢纽，通过促进炎症小体过度活化加剧细胞因子风暴[20]。因此，深入探究N蛋白的分子功能，对揭示冠状病毒致病机制及开发新型防控策略具有重要意义。

PDCoV是δ属冠状病毒中目前唯一成功分离的代表种，其*N*基因编码342个氨基酸[21]。作为新发病毒，其N蛋白致病机制研究尚不深入。现有研究多集中于N蛋白对IFN-I通路的拮抗作用。Ji等[22-23]发现PDCoV N蛋白可物种特异性地促进猪干扰素调节因子7（interferon regulatory factor 7, IRF7）降解，从而抑制IFN-I的表达；此外，该蛋白的NTD可与胞内模式识别受体RIG-I结合，阻碍其与dsRNA结合，

进而抑制IFN-β产生。Hu等[24]证实PDCoV N蛋白的CTD可直接作用于信号转导和转录激活因子1（STAT1），通过抑制其核易位来阻断IFN-I介导的JAK-STAT通路激活。此外，研究发现多种宿主蛋白（如FBXW8、PGAM5和LDHB）可识别N蛋白并介导其发生自噬降解，从而抑制病毒复制[25-27]。然而，以上研究大多基于病毒感染或N蛋白瞬时表达体系，存在病毒多蛋白干扰、表达水平波动及持续时间短等局限，难以精准剖析N蛋白单独、持续表达所引起的生物学效应。目前仍缺乏能够在稳定表达状态下系统研究PDCoV N蛋白对宿主细胞稳态全局性影响的细胞模型。

鉴于此，本研究旨在构建能够稳定表达PDCoV N蛋白的细胞株，并开展初步功能探究，为在接近生理的持续表达水平下，深入揭示N蛋白在感染过程中的多功能角色，尤其是其长期作用于宿主细胞所引发的病理生理改变机制，提供一个稳定可靠、条件可控的研究平台。

1 材料与方法

1.1 材料

HEK-293FT细胞、LLC-PK细胞、质粒pMD2.G、psPAX2、IFN-β-Luc和pRL-TK为本实验室保存；PDCoV、SeV和VSV-GFP病毒为本实验室保存；嘌呤霉素、GAPDH鼠单抗、Alexa Fluor 488标记羊抗鼠IgG、RIPA裂解液、特超敏ECL化学发光试剂盒和Lipo293 Plus转染试剂均购自碧云天公司；DMEM高糖培养基、特级胎牛血清、PBS缓冲液、HRP标记的羊抗鼠IgG、BCA法微量蛋白质浓度测定试剂盒和SGExcel Fast-SYBR Master预混液均购自上海生工公司；PDCoV-N鼠单抗购自Medgene Labs公司；PDCoV-S鼠单抗购自千寻生物公司；DAPI染色液购自博士德生物公司；RNAiso Plus和PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser购自TaKaRa公司；CCK-8试剂盒、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒购自翌圣生物公司；双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自Zeta Life公司。

1.2 方法

1.2.1 3个谱系PDCoV毒株N蛋白序列差异分析及慢病毒质粒构建 参考NCBI GenBank数据库公布的194条PDCoV全基因组序列，使用SplitsTree 5软件和Kimura 2参数模型对PDCoV全基因组进行系统发育分析[28]。选取3个谱系代表性PDCoV毒株（MW685623、MW685624、KU051641），通过AlphaFold 3对3个谱系PDCoV N蛋白进行三维结构模拟，并进行氨基酸序列对比分析[29]。为探究PDCoV N蛋白生物学功能，将上述3个毒株*N*基因在上海生工公司进行全基因合成，并分别克隆至pLVX-Puro慢病毒载体上。

1.2.2 3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株构建及鉴定

（1）3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株的构建。首先通过剂量梯度法测定LLC-PK细胞的嘌呤霉素最低致死浓度为4 μg/mL。将3个谱系PDCoV *N*基因慢病毒质粒与包装质粒psPAX2、pMD2.G按2∶2∶1的比例，使用Lipo293 Plus共转染至HEK-293FT细胞。48 h后收集病毒上清液，并进行超滤浓缩。采用上述浓缩病毒液（MOI=0.3）感染LLC-PK细胞，同时加入8 μg/mL的polybrene以增强感染效率。感染3–4 d后，更换为含4 μg/mL嘌呤霉素的完全培养液进行初步筛选，获得阳性多克隆细胞群。最后，通过有限稀释法筛选单克隆稳转细胞株：将细胞以每孔约1个的密度接种于96孔板，次日挑选并标记出单克隆的孔，扩大培养后用于后续实验。

（2）3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株的鉴定。间接免疫荧光法观察PDCoV N蛋白亚细胞定位：细胞经4% 多聚甲醛固定、0.25% Triton X-100透化及1% BSA封闭后，加入PDCoV N蛋白鼠单抗（1∶300），室温孵育3 h；PBS润洗后，加入Alexa Fluor 488标记的羊抗鼠IgG（1∶500）于室温避光孵育1 h；DAPI染细胞核后，于共聚焦显微镜下观察并采集图像。Western blot法检测N蛋白表达：细胞经PBS清洗后，使用RIPA裂解液于冰上裂解，离心取上清；BCA法测定蛋白浓度，取20 μg蛋白经变性后进行SDS-PAGE电泳，并转印至PVDF膜，室温封闭1 h；分别以抗PDCoV N蛋白鼠单克隆抗体（1∶2 000）与抗GAPDH鼠单克隆抗体（1∶2 000）为一抗，4 ℃孵育过夜；TBST洗涤5次后以HRP标记的羊抗鼠IgG（1∶4 000）为二抗室温孵育1 h，ECL显影后于成像系统观察。3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株mRNA水平鉴定：收集对照组LLC-PK细胞及3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞，使用Trizol法提取总

RNA并反转录为cDNA；以此为模板进行PCR扩增随后进行测序分析。

（3）CCK-8法检测PDCoV N蛋白稳转细胞株的增殖活性。将对照组LLC-PK细胞与3个谱系稳转细胞株以每孔1×10^4个细胞接种于96孔板中，分别于12、24和36 h进行检测。每孔加入10 μL CCK-8溶液，轻微振荡混匀，置于培养箱中37 ℃孵育1–4 h，使用酶标仪于450 nm波长处检测各孔的OD值。细胞相对活性计算公式如下：相对细胞活性（%）=（实验组OD值–空白孔OD值）/（对照组OD值–空白孔OD值）×100%，以对照组细胞的相对活性为100%进行归一化计算。

1.2.3　PDCoV N蛋白稳定表达对I型干扰素及下游刺激基因的影响

（1）双荧光素酶报告基因检测PDCoV N蛋白对IFN-β活化的影响。将3个谱系稳转细胞株和对照组LLC-PK细胞分别接种于24孔板中。培养24 h后将IFN-β-Luc报告质粒和pRL-TK内参质粒按5∶1的比例进行共转染。转染24 h后以相同感染复数（MOI=0.1）接种SeV病毒，感染12 h后进行荧光素酶活性检测。具体操作流程参照Zeta Life公司荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书。

（2）qPCR检测PDCoV N蛋白对*IFN-β*1及下游刺激基因表达的影响。将3个谱系稳转细胞株和对照组LLC-PK细胞以每孔1×10^5个细胞的密度分别接种于12孔板中。培养24 h后以相同感染复数（MOI=0.1）接种SeV病毒，分别于感染后0、12和24 h收集细胞。使用Trizol法提取细胞总RNA，并逆转录为cDNA；以*GAPDH*为内参基因，通过qPCR测定*IFN-β*1和干扰素刺激基因（interferon-stimulated genes, *ISGs*）家族成员*ISG*56、*ISG*15和*MX*1在转录水平的相对表达量（引物序列详见附表1），采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$公式计算基因的相对表达量[30]。

（3）PDCoV N蛋白稳定表达对VSV-GFP复制的影响。将生长状态良好的对照组LLC-PK细胞与3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株接种至6孔板中，待细胞生长至80%汇合度后，弃去培养液，用PBS洗涤1次，以相同感染复数（MOI=0.1）接种VSV-GFP，感染24 h后，用荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达情况。

1.2.4　PDCoV N蛋白稳定表达对LLC-PK细胞周期的影响　将处于对数生长期的野生型LLC-PK细胞与3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株以每孔2.5×10^5个细胞接种于6孔板中。待细胞完全贴壁后，更换为含0.5% FBS的培养基进行同步化处理36 h，随后更换为含10% FBS的完全培养基，此时间点记为0 h。分别于换液后0、12和24 h收集细胞，使用流式细胞仪检测细胞周期。数据以均值±标准误表示，每个时间点设置3个生物学重复。具体操作流程参照翌圣生物公司细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒说明书。

1.2.5　PDCoV N蛋白稳定表达对PDCoV增殖的影响

（1）qPCR绝对定量法检测PDCoV病毒增殖差异。将3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株和对照组LLC-PK细胞分别接种于12孔板中。培养24 h后以相同感染复数（MOI=0.1）接种PDCoV病毒，分别于感染后2、6、12和48 h收集细胞上清液。经Trizol法提取总RNA并逆转录为cDNA后，进行qPCR绝对定量分析，检测引物PDMq-F/R序列如附表1所示。以质粒pLVX-N为标准品建立标准曲线，通过比较各时间点病毒基因组拷贝数的差异，评估N蛋白对PDCoV增殖的影响。

（2）基于S蛋白的间接免疫荧光法检测不同稳转细胞株中PDCoV增殖差异。将3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株和对照组LLC-PK细胞以每孔1.0×10^4个细胞的密度分别接种于96孔板中。培养24 h后以相同感染复数（MOI=0.1）接种PDCoV病毒。感染48 h后以PDCoV S蛋白鼠单抗（1∶300）为一抗，Alexa Fluor 488标记的羊抗鼠IgG（1∶500）为二抗，检测不同细胞中PDCoV S蛋白的表达差异，方法参照1.2.2。

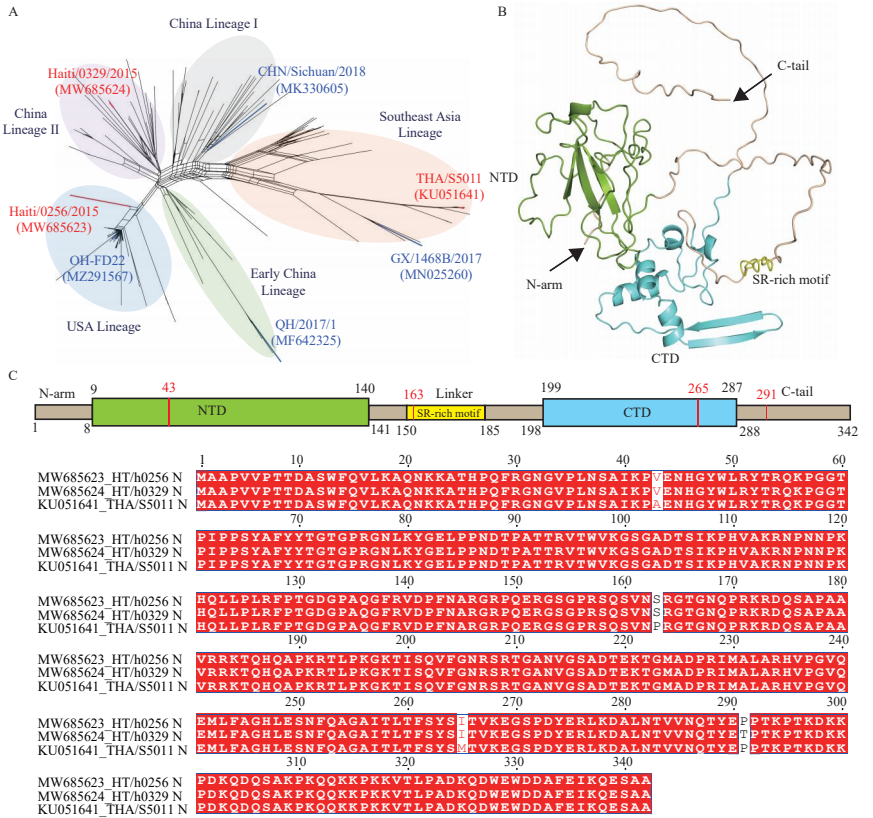
1.2.6　统计学分析与生物学重复　以上实验均设置3次独立生物学重复，实验数据以平均值±标准误表示。统计学分析采用GraphPad Prism 10.0软件完成，两组间比较采用双因素方差分析，统计学差异以星号标注：*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001，****P<0.000 1；无星号表示组间差异无统计学意义。

2　结果

2.1　3个谱系PDCoV毒株N蛋白功能域及氨基酸水平差异分析

为解析PDCoV N蛋白的遗传变异特征与生物学

功能，基于全基因组系统发育分析，选取3个谱系PDCoV代表株：北美谱系人源毒株MW685623_HT/h0256、中国谱系人源毒株MW685624_HT/h0329和东南亚谱系猪源毒株KU051641_THA/S5011（图1-A）。通过三维结构模拟与多序列比对分析发现，相较于2个人源PDCoV毒株，东南亚谱系S5011毒株的N蛋白在NTD（V43A）、SR-rich motif（S163P）和CTD（I265M）处存在3个谱系特异性变异位点；此外，MW685624_HT/h0329毒株N蛋白在C-tail（P291T）处存在独特变异（图1-B, C）。为探究PDCoV N蛋白的生物学功能，本研究成功构建了包含上述3个谱系PDCoV *N*基因的重组慢病毒质粒。



A：基于194条PDCoV全基因组序列的系统发育谱系分型（红色标记为所选取的3个谱系PDCoV代表株）；B：PDCoV N蛋白结构域示意图（绿色：N端结构域；青色：C端结构域；黄色：SR富集区）；C：3个谱系PDCoV N蛋白氨基酸序列差异比对

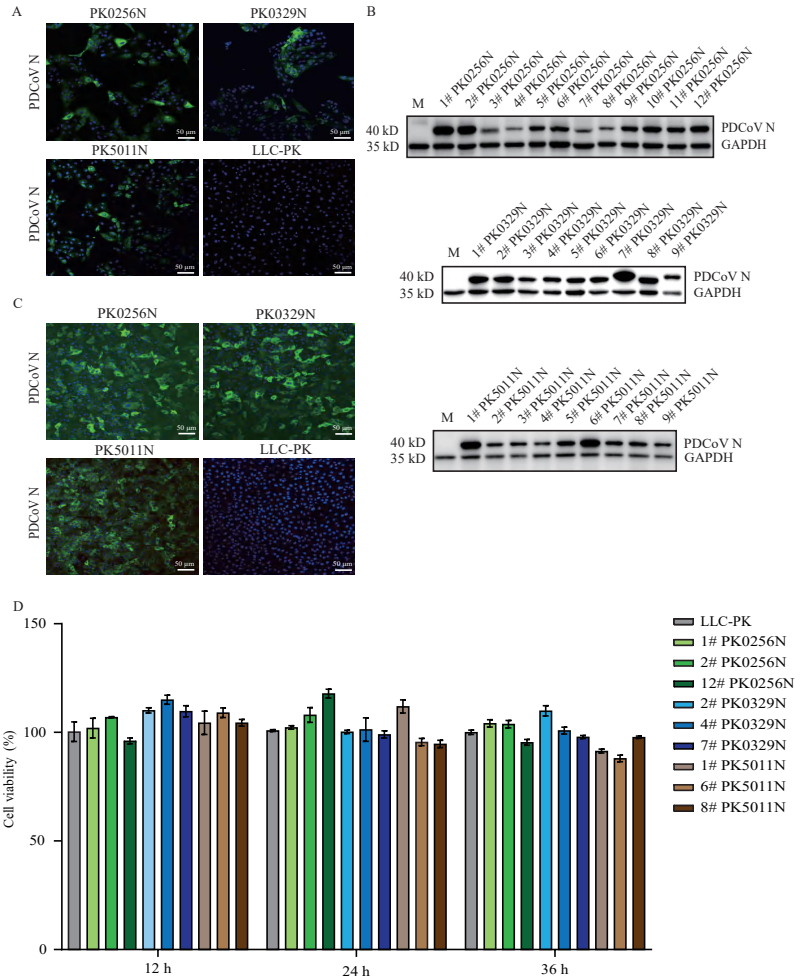
A: Phylogenetic genotyping based on 194 complete-genome sequences of PDCoV (red indicates representative strains of PDCoV from three lineages). B: Schematic diagram of PDCoV N protein domain (Green: NTD. Cyan: CTD. Yellow: SR-rich motif). C: Amino acid sequence alignment of N proteins from three PDCoV lineages

图1 3个谱系PDCoV毒株N蛋白功能域及氨基酸水平差异分析

Fig. 1 Functional domain and amino acid levels analysis of N protein from three PDCoV lineages

2.2 3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株的构建与鉴定

为构建稳定表达3个谱系PDCoV N蛋白的单克隆细胞株，首先利用慢病毒包装系统分别构建了3个谱系PDCoV N蛋白的多克隆细胞株。间接免疫荧光法检测结果显示，3个谱系N蛋白均成功表达，并定位于细胞质与细胞核中（图2-A）。随后，采用有限稀释法对多克隆细胞进行单克隆化筛选，并通过Western blot验证蛋白表达水平。结果（图2-B）显示，共获得30株稳定表达PDCoV N蛋白的单克隆细胞株，其中PK0256N细胞12株、PK0329N细胞9株及PK5011N细胞9株。经连续传代培养后，基于N蛋白鼠单抗的间接免疫荧光法检测结果显示，3个谱系N蛋白单克隆细胞在检测视野下的每个细胞中均



A：间接免疫荧光法检测3个谱系PDCoV N蛋白在多克隆细胞株中的表达与定位（比例尺：50 μm）；B：Western blot法检测3个谱系单克隆稳转细胞株中N蛋白的表达水平（M：LLC-PK对照细胞）；C：间接免疫荧光检测3个谱系单克隆稳转细胞株中N蛋白的表达（比例尺：50 μm）；D：CCK-8法检测3个谱系稳转细胞株的细胞增殖活性，纵坐标为细胞活力，横坐标为检测时间点；*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001、****P<0.000 1；无星号表示组间差异无统计学意义。下同

A: Indirect immunofluorescence assay for detecting the expression and localization of PDCoV N protein from three lineages in polyclonal cell lines (scale bar: 50 μm). B: Western blot analysis of N protein expression levels in monoclonal stable cell lines of three PDCoV lineages (M: LLC-PK control cells). C: Indirect immunofluorescence assay for detecting the expression of N protein in monoclonal stable cell lines of three PDCoV lineages (scale bar: 50 μm). D: CCK-8 assay for evaluating the proliferative activity of stable cell lines of three PDCoV lineages; the ordinate represents cell viability, and the abscissa represents detection time points. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.000 1. No asterisk indicates no statistically significant difference between groups. The same below

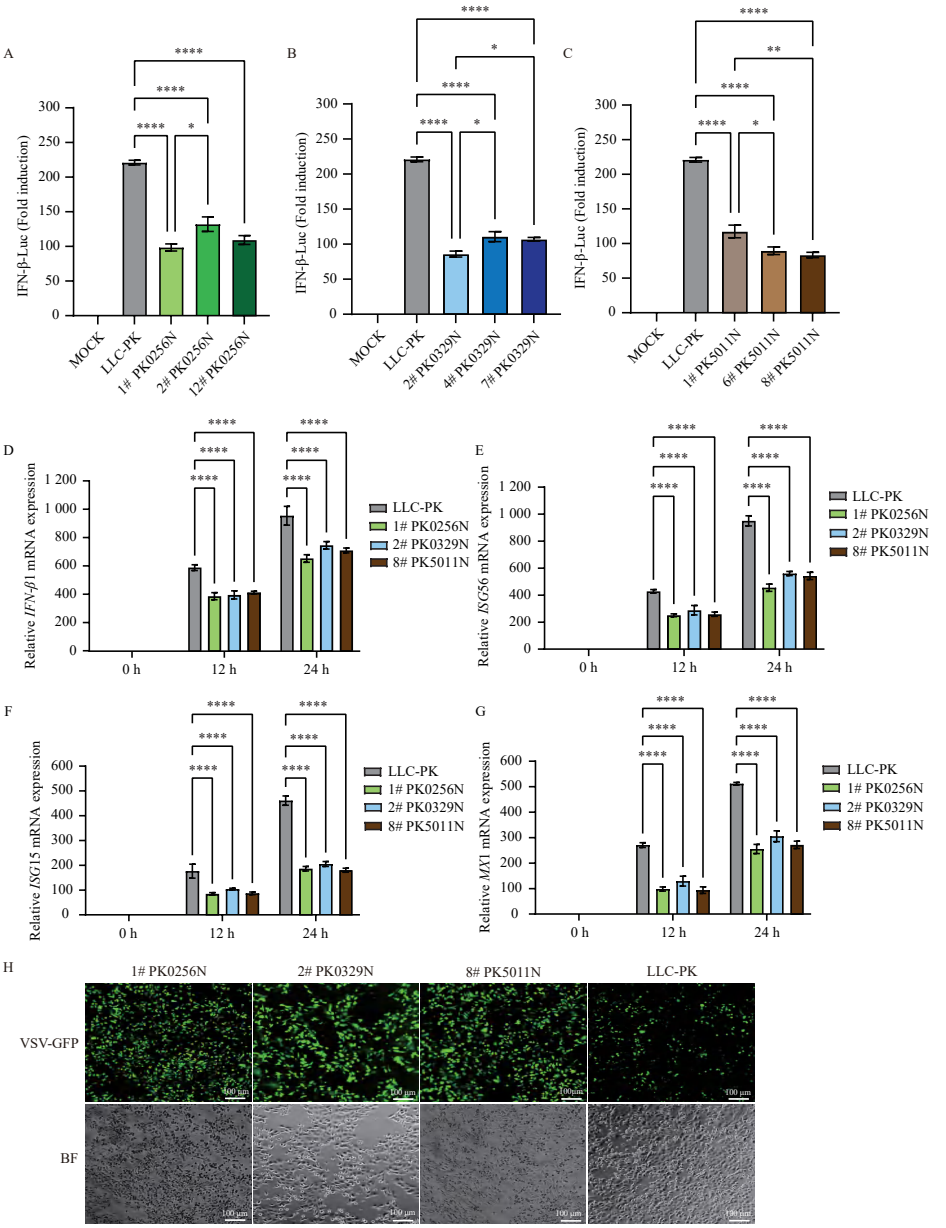
图2　3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株的构建与鉴定

Fig. 2　Construction and identification of stable cell lines expressing the N protein from three PDCoV lineages

可见绿色荧光信号，初步表明3个谱系PDCoV N蛋白细胞株是由单个克隆增殖而来（图2-C）。此外，CCK-8细胞增殖活性检测结果显示，与野生型LLC-PK细胞相比，3个谱系N蛋白单克隆稳转细胞株的增殖活性均无显著差异（图2-D，P>0.05）。以上结果表明，3个谱系PDCoV N蛋白单克隆稳转细胞株已构建成功。

2.3　PDCoV N蛋白稳定表达抑制I型干扰素及下游刺激基因表达

为解析PDCoV N蛋白对宿主I型干扰素的影响，本研究通过双荧光素酶报告系统检测IFN-β启动子活性。结果（图3-A–C）显示，3个谱系PDCoV N蛋白的稳定表达均能显著抑制SeV诱导的IFN-β启动子活化；根据抑制效率，筛选出效果最显著的



A–C：双荧光素酶报告系统检测3个谱系PDCoV N蛋白对SeV诱导的IFN-β启动子活化的影响（MOCK：空白对照）；D–G：RT-qPCR检测3个谱系稳转细胞株中SeV诱导的*IFN-β*1（D）、*ISG*56（E）、*ISG*15（F）及*MX*1（G）基因mRNA的相对表达水平；H：荧光显微镜观察PDCoV N蛋白对VSV-GFP复制的影响（绿色荧光强度代表VSV复制水平；比例尺：100 μm）

A–C: Analysis of the effect of N proteins from three PDCoV lineages on SeV-induced IFN-β promoter activity using a dual-luciferase reporter assay system (MOCK: Mock control). D–G: Detection of the relative mRNA expression levels of SeV-induced *IFN-β*1 (D), *ISG*56 (E), *ISG*15 (F) and *MX*1 (G) genes in stable cell lines of different PDCoV lineages by RT-qPCR. H: Fluorescence microscopy observation of the effect of PDCoV N protein on VSV-GFP replication (green fluorescence intensity indicates VSV replication level. scale bar: 100 μm)

图3 PDCoV N蛋白抑制IFN-β活化及下游刺激基因激活

Fig. 3 PDCoV N protein suppresses IFN-β activation and downstream stimulated gene expression

1# PK0256N、2# PK0329N和8# PK5011N稳转细胞株，用于后续研究。在SeV感染模型中，RT-qPCR检测结果显示，与野生型LLC-PK细胞相比，3个谱系稳转细胞株中*IFN-β*1的转录水平分别下调约

31.6%、21.8%和25.7%；其下游干扰素刺激基因（*ISGs*）中，*ISG*56表达量分别下调约52.1%、41.1%和42.9%，*ISG*15表达量分别下调约59.6%、55.5%和60.9%，*MX*1表达量分别下调约50.1%、40.2%和46.9%（图3-D-G，P<0.000 1）。上述数据表明，N蛋白的稳定表达可显著抑制I型干扰素及其下游刺激基因的转录激活。为在功能层面进一步验证PDCoV N蛋白抑制干扰素通路的下游生物学效应，本研究选用水疱性口炎病毒（VSV-GFP）作为报告病毒进行感染实验。结果（图3-H）显示，稳定表达N蛋白的细胞中绿色荧光信号强度显著高于对照组，提示N蛋白可通过抑制IFN-I通路的激活促进VSV复制。以上结果表明，PDCoV N蛋白能够通过抑制I型干扰素通路的活化从而削弱宿主固有抗病毒免疫应答。

2.4　3个谱系PDCoV毒株N蛋白诱导LLC-PK细胞S期阻滞

为探究PDCoV N蛋白对宿主细胞周期的调控作用，本研究采用流式细胞术检测LLC-PK细胞与3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株的细胞周期分布特征。结果（图4）显示，经血清饥饿同步化处理并恢复培养12 h后，LLC-PK细胞的S期细胞比例约为（25.20±0.45）%。相比之下，3个谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株的S期细胞比例均显著上调，分别约为（34.47±0.32）%、（30.70±0.38）%和（32.83±0.35）%。以上结果表明，N蛋白的稳定表达可诱导LLC-PK细胞发生S期阻滞。

2.5　3个谱系PDCoV毒株N蛋白稳定表达促进PDCoV病毒的复制与增殖

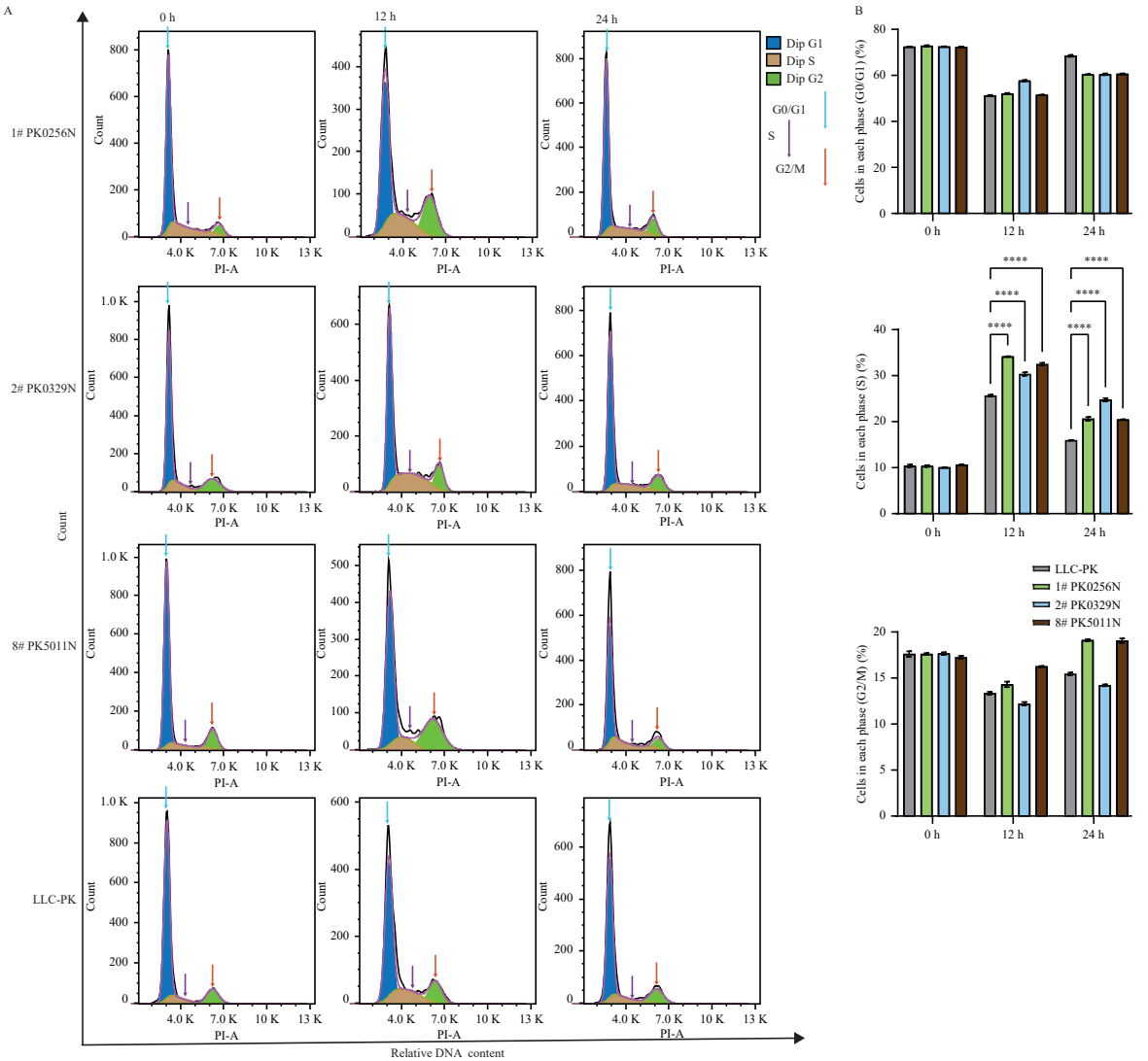
为探究N蛋白稳定表达对PDCoV增殖的影响，用PDCoV感染野生型LLC-PK细胞及3个谱系的N蛋白稳转细胞株，分别于感染后2、6、12和48 h收集细胞上清，并通过RT-qPCR检测病毒拷贝数。结果（图5-A）显示，感染48 h后，3个谱系稳转细胞株上清中的病毒拷贝数分别达到3.08×10^{12}、1.62×10^{12}、3.27×10^{12} copies/mL，均显著高于野生型LLC-PK细胞上清中病毒拷贝数的3.25×10^{11} copies/mL（P<0.000 1）。此外，基于S蛋白鼠单抗的间接免疫荧光法检测结果显示（图5-B），3个谱系稳转细胞株中S蛋白的绿色荧光信号均较野生型细胞显著增强，提示稳转细胞株中病毒的复制增殖能力显著提升。以上结果表明，PDCoV N蛋白的稳定表达可显著促进PDCoV病毒的复制与增殖。

3　讨论

近年来，SARS-CoV、MERS-CoV及SARS-CoV-2等β属冠状病毒的多次暴发流行，凸显了动物源性冠状病毒跨物种“外溢”的重要公共卫生风险[3]。PDCoV作为一种新发现的、可跨物种感染人的δ属冠状病毒，其“外溢”可对公共卫生构成新威胁[14]。冠状病毒N蛋白是兼具结构支撑与免疫调节功能的关键毒力因子，针对性开展N蛋白致病机制研究，对于冠状病毒前瞻性防控具有重要意义[31]。本研究基于系统发育分析与宿主来源特征，选取2个人源毒株（北美谱系、中国谱系）和1个猪源毒株（东南亚谱系）进行序列比对分析，构建了稳定表达3个毒株N蛋白的LLC-PK单克隆细胞株，初步评估了N蛋白持续表达对宿主固有免疫、细胞周期及病毒增殖的影响。

冠状病毒N蛋白通过拮抗宿主固有免疫（如IFN-I通路等）实现免疫逃逸，这是其致病机制的核心策略之一[32]。本研究发现，3个谱系PDCoV N蛋白均能显著抑制SeV诱导的IFN-β启动子活化，并显著抑制关键干扰素刺激基因（*ISG*56、*ISG*15和*MX*1）的表达。这一结果与既往基于瞬时表达或病毒感染的研究结论一致[22]。N蛋白的稳定表达排除了其他病毒蛋白及表达水平波动对宿主固有免疫拮抗作用的影响，证实N蛋白可独立和持续地发挥免疫抑制作用。此外，VSV-GFP感染实验也证实这种免疫抑制可为模式病毒的复制创造有利条件。基于既往研究推测，其机制可能与N蛋白和RIG-I、STAT1等IFN-I通路关键信号分子的相互作用有关[23-24]。本研究构建的稳转细胞株，可为后续精准定位N蛋白抑制IFN-I通路的关键靶点及动态过程提供研究工具。

本研究发现，PDCoV N蛋白可诱导宿主细胞周期发生S期阻滞。调控细胞周期是许多病毒篡夺宿主资源为自身复制服务的重要策略。例如SARS-CoV-2 N蛋白可诱导γ-H2AX高表达，间接干扰CDK/cyclin复合物功能，使细胞阻滞于S期[33]。本研究在3个不同谱系PDCoV N蛋白稳转细胞株中均观察到S期阻滞，提示诱导S期阻滞是冠状病毒N蛋白的一种保守致病策略，这为理解PDCoV如何重塑宿主



A:流式细胞术检测血清饥饿同步化处理后,不同时间点(0、12和24 h)野生型LLC-PK与PDCoV N蛋白稳转细胞株的细胞周期代表性图谱(蓝色:G0/G1期;棕色:S期;绿色:G2/M期);B:不同时间点G0/G1期、S期及G2/M期细胞占比的统计结果

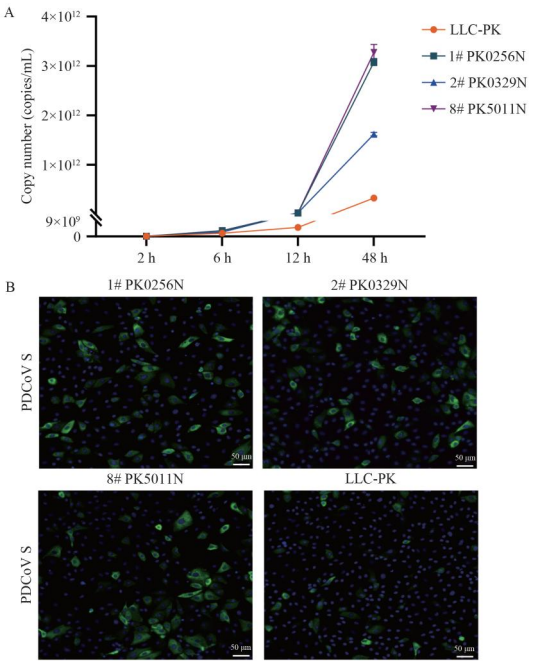
A: Representative cell cycle profiles of wild-type LLC-PK cells and PDCoV N protein stably transfected cell lines detected by flow cytometry at different time points (0, 12 and 24 h) after serum starvation synchronization (Blue: G0/G1 phase. Brown: S phase. Green: G2/M phase). B: Statistical results of the proportions of cells in G0/G1, S and G2/M phases at different time points

图4 PDCoV N蛋白诱导LLC-PK细胞S期阻滞

Fig. 4 PDCoV N protein induces S-phase arrest in LLC-PK cells

细胞微环境以利于自身增殖提供了新的视角。病毒感染介导的细胞周期阻滞涉及多种分子机制，包括细胞应激反应、DNA损伤应答以及细胞周期检查点调控等。Costa-Mattioli等[34]综述了整合应激反应（ISR）在病毒感染等多种应激条件下的激活机制；Luftig[35]总结了DNA和RNA病毒对DNA损伤应答（DDR）细胞通路的激活与拮抗策略；Bagga等[36]梳理了DNA与RNA病毒靶向细胞周期调节因子、干扰检查点控制等多种调控细胞周期的策略。PDCoV N蛋白是否也通过上述机制诱导S期阻滞，尚需在所构建的细胞株中进一步验证；其具体作用通路是未来的研究重点。

本研究还发现，3个谱系毒株N蛋白的稳定表达均可显著促进PDCoV的复制，这可能与上述免疫抑



A：qPCR绝对定量法检测3个谱系N蛋白稳转细胞株上清中PDCoV的一步生长曲线；B：基于S蛋白鼠单克隆抗体的间接免疫荧光法检测PDCoV的复制增殖情况（比例尺：50 μm）

A: Replication kinetics of PDCoV in supernatants of N protein stable cell lines from three lineages using absolute quantitative qPCR. B: Immunofluorescence detection of PDCoV proliferation in stable cell lines expressing the N protein using an anti-spike monoclonal antibody (scale bar: 50 μm)

图5　PDCoV N蛋白促进PDCoV的复制及增殖

Fig. 5　PDCoV N protein enhances PDCoV replication and proliferation

制和细胞周期重塑的共同作用有关。拮抗IFN-I通路削弱了细胞的抗病毒状态，S期阻滞则可能提供资源与时间窗口，二者协同为病毒增殖创造有利条件。此外，冠状病毒N蛋白还能够直接调控病毒基因组的不连续转录、模板转换及RNA分子伴侣活性等过程，进而促进病毒的复制增殖[37]；PDCoV N蛋白的稳定表达亦可能通过上述机制促进病毒复制，但其具体机制尚需探究。另外，本研究发现，尽管3个谱系毒株的N蛋白在关键功能域（NTD、SR-rich motif和CTD）中存在个别氨基酸突变，但其功能表型一致，提示这些功能可能由其保守结构域主导，这一保守性也凸显了N蛋白在同种属病毒生命周期中的核心作用。因此，N蛋白可作为开发广谱抗病毒策略（如靶向其保守功能域的小分子抑制剂）的潜在重要靶标。

值得注意的是，本研究构建的稳转细胞株仅在非感染条件下为解析N蛋白的独立功能提供了稳定研究工具。N蛋白的组成型表达与病毒持续性感染后期N蛋白的长期存在具有一定相似性，但并不能完全模拟天然感染的全过程。因此，后续研究可利用N蛋白的可诱导表达系统，并结合细胞或动物感染模型开展平行研究，以更深入地揭示N蛋白的生理功能。

4　结论

成功构建了稳定表达3个不同谱系PDCoV N蛋白的LLC-PK单克隆细胞株。N蛋白的持续表达能显著抑制IFN-I通路、诱导宿主细胞S期阻滞，并促进PDCoV的复制与增殖。所构建的稳转细胞株为解析N蛋白与宿主的相互作用网络、阐明其多重致病机制以及开发靶向N蛋白的新型抗病毒策略，提供了稳定可靠且条件可控的研究工具。

文章所有附表数据请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260509174224_NewsFile_38.pdf）。

参考文献

[1] Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses [J]. Nat Rev Microbiol, 2019, 17(3): 181-192.

[2] Ye ZW, Yuan SF, Yuen KS, et al. Zoonotic origins of human coronaviruses [J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(10): 1686-1697.

[3] Ruiz-Aravena M, McKee C, Gamble A, et al. Ecology, evolution and spillover of coronaviruses from bats [J]. Nat Rev Microbiol, 2022, 20(5): 299-314.

[4] Miranda C, Silva V, Igrejas G, et al. Genomic evolution of the human and animal coronavirus diseases [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(9): 6645-6653.

[5] Zhang JQ. Porcine deltacoronavirus: Overview of infection dynamics, diagnostic methods, prevalence and genetic evolution [J]. Virus Res, 2016, 226: 71-84.

[6] Wang QH, Vlasova AN, Kenney SP, et al. Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs [J]. Curr Opin Virol, 2019, 34: 39-49.

[7] Shan XT, Li R, Ma X, et al. Epidemiology, pathogenesis, immune evasion mechanism and vaccine development of porcine Deltacoronavirus [J]. Funct Integr Genomics, 2024, 24(3): 79.

[8] He WT, Ji X, He W, et al. Genomic epidemiology, evolution, and transmission dynamics of porcine deltacoronavirus [J]. Mol Biol Evol, 2020, 37(9): 2641-2654.

[9] Tang P, Cui EH, Song YH, et al. Porcine deltacoronavirus and its prevalence in China: a review of epidemiology, evolution, and vaccine development [J]. Arch Virol, 2021, 166(11): 2975-2988.

[10] Bahoussi AN, Wang PH, Shah PT, et al. Evolutionary plasticity of zoonotic porcine Deltacoronavirus (PDCoV): genetic characteristics and geographic distribution [J]. BMC Vet Res, 2022, 18: 444.

[11] Jung K, Hu H, Saif LJ. Porcine deltacoronavirus infection: Etiology, cell culture for virus isolation and propagation, molecular epidemiology and pathogenesis [J]. Virus Res, 2016, 226: 50-59.

[12] Vlasova AN, Kenney SP, Jung K, et al. Deltacoronavirus evolution and transmission: current scenario and evolutionary perspectives [J]. Front Vet Sci, 2021, 7: 626785.

[13] Tian YY, Sun JQ, Hou XH, et al. Cross-species recognition of two porcine coronaviruses to their cellular receptor aminopeptidase N of dogs and seven other species [J]. PLoS Pathog, 2025, 21(1): e1012836.

[14] Lednicky JA, Tagliamonte MS, White SK, et al. Independent infections of porcine deltacoronavirus among Haitian children [J]. Nature, 2021, 600(7887): 133-137.

[15] Su S, Wong G, Shi WF, et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses [J]. Trends Microbiol, 2016, 24 (6): 490-502.

[16] Ye QZ, West AMV, Silletti S, et al. Architecture and self-assembly of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein [J]. Protein Sci, 2020, 29 (9): 1890-1901.

[17] Chen H, Cui Y, Han XL, et al. Liquid-liquid phase separation by SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and RNA [J]. Cell Res, 2020, 30(12): 1143-1145.

[18] Cong YY, Ulasli M, Schepers H, et al. Nucleocapsid protein recruitment to replication-transcription complexes plays a crucial role in coronaviral life cycle [J]. J Virol, 2020, 94(4): e01925-e01919.

[19] Mu JF, Fang YH, Yang Q, et al. SARS-CoV-2 N protein antagonizes type I interferon signaling by suppressing phosphorylation and nuclear translocation of STAT1 and STAT2 [J]. Cell Discov, 2020, 6: 65.

[20] Pan P, Shen MM, Yu ZY, et al. SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation [J]. Nat Commun, 2021, 12: 4664.

[21] Hu H, Jung K, Vlasova AN, et al. Isolation and characterization of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhea in the United States [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(5): 1537-1548.

[22] Ji LK, Li SS, Zhu WX, et al. Porcine deltacoronavirus nucleocapsid protein suppressed IFN-β production by interfering porcine RIG-I dsRNA-binding and K63-linked polyubiquitination [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1024.

[23] Ji LK, Wang N, Ma JJ, et al. Porcine deltacoronavirus nucleocapsid protein species-specifically suppressed IRF7-induced type I interferon production via ubiquitin-proteasomal degradation pathway [J]. Vet Microbiol, 2020, 250: 108853.

[24] Hu YT, Hao CL, Wang DH, et al. Porcine deltacoronavirus nucleocapsid protein antagonizes JAK-STAT signaling pathway by targeting STAT1 through KPNA2 degradation [J]. J Virol, 2024, 98 (7): e00334-e00324.

[25] Ji LK, Zhou LY, Wang Y, et al. FBXW8 suppresses PDCoV proliferation via the NPD52-dependent autophagic degradation of a viral nucleocapsid protein [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1457255.

[26] Yang XY, Kong N, Qin WZ, et al. PGAM5 degrades PDCoV N protein and activates type I interferon to antagonize viral replication [J]. J Virol, 2023, 97(11): e01470-e01423.

[27] Wu XH, Lan SJ, Wang Y, et al. LDHB suppresses the PDCoV proliferation by targeting viral nucleocapsid protein for autophagic degradation [J]. Microbiol Spectr, 2025, 13(5): e02787-e02724.

[28] Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies [J]. Mol Biol Evol, 2006, 23(2): 254-267.

[29] Abramson J, Adler J, Dunger J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3 [J]. Nature, 2024, 630(8016): 493-500.

[30] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[31] El-Maradny YA, Badawy MA, Mohamed KI, et al. Unraveling the role of the nucleocapsid protein in SARS-CoV-2 pathogenesis: From viral life cycle to vaccine development [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 279: 135201.

[32] Zhao YH, Sui LY, Wu P, et al. A dual-role of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in regulating innate immune response [J]. Sig Transduct Target Ther, 2021, 6: 331.

[33] Liu JM, Liu MY, Yu XY, et al. SARS-CoV-2 nucleocapsid protein delays cell cycle in S-phase [J]. Int J Med Microbiol, 2025, 320: 151671.

[34] Costa-Mattioli M, Walter P. The integrated stress response: From mechanism to disease [J]. Science, 2020, 368(6489): eaat5314.

[35] Luftig MA. Viruses and the DNA damage response: activation and antagonism [J]. Annu Rev Virol, 2014, 1: 605-625.

[36] Bagga S, Bouchard MJ. Cell cycle regulation during viral infection [M]// Noguchi E, Gadaleta MC. Cell Cycle Control: Mechanisms and Protocols. New York: Springer, 2014: 165-227.

[37] Bezerra PR, Almeida FCL. Structural basis for the participation of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in the template switch mechanism and genomic RNA reorganization [J]. J Biol Chem, 2024, 300(11): 107834.

（责任编辑　李楠）