生物技术通报
SHENGWU JISHU TONGBAO
2026 年 第 42 卷 第 11 期
（总第412期）

目 次

综述与专论

水杨酸甲酯酶及其介导的植物抗病性研究进展
…… 侯坤鹏 徐莉萍 王邢斌 张雨晴 王文强 霍子函 赵晨阳 徐硕 张智强 苟明月（1）

钙调蛋白介导的转录调控机制在植物非生物胁迫中的研究进展
…… 常宇晴 杜佳 郭杭 徐静 王一帆 汪尚 杜立群 曾后清（11）

球孢白僵菌促进植物生长的作用机制及应用进展
…… 叶霄 孙佩 童文 许文志 黄雯 陶珊 龙燕梅（24）

橡胶树抗寒相关转录因子研究进展 …… 刘妮 李陈万里 牛迎凤 毛常丽 柳觐（35）

AA9家族裂解性多糖单加氧酶的研究进展 …… 李聪 于濡沄 郑菲 郭玉杰（45）

基于*CD163*基因编辑的抗蓝耳猪研究进展 …… 赵芯悦 曾威 张立苹 夏继桥 毕延震（58）

患者来源肿瘤类器官在PROTAC开发中的应用
…… 刘亚琪 李瑶宣 刘含霄 李孟娜 杨竞超 陈兵 杨凤堂 李敬瑞（70）

技术与方法

CRISPR-Cas反式切割技术在动物病原体多重核酸检测中的应用进展
…… 张津慎 余永涛 戚姣姣 何海洋（81）

研究报告

OsTrxL1与OsCYP89A2互作协同调控水稻干旱胁迫响应
…… 钟娇 任琼 范照睿 段玉 秦童 康振辉（92）

大豆种皮色泽的QTL定位
…… 李雅迁 冯龙哲 孙楠 张豪 张艺杰 杨雅琪 张欣宇 岳爱琴 杜维俊 王敏（103）

甘薯*IbBADH*基因家族全基因组鉴定与*IbBADH1a*上游转录调控因子筛选
…… 周广立 陈锦钗 李鑫鑫 武小平 贾峥嵘 阎昊 贺立恒 贾小云（113）

黄瓜*CsWRKY12*基因的克隆及抗旱功能鉴定
…… 李昌焱 夏康力 王蒙 杨凤 郭学平 胡朝阳 周跃龙 刘世强 周勇（124）

蓝莓全基因组SSR引物开发及遗传多样性分析
…… 刘思文 王博伟 邢金杰 王静 李亚东 孙海悦（134）

菊花*CmJAZ1*基因负调控干旱胁迫的功能分析 …… 李家群 张煜婷 张新仪 保嘉佳 严瑞（145）

紫花苜蓿*MsCZF29*基因克隆及耐冻功能分析 …… 范雨馨 任乃芃 轩一芙 臧辉 刘香萍（154）

石仙桃中天麻素合成相关糖基转移酶基因的克隆与表达分析
…… 刘保财 胡学博 赵云青 黄颖桢 张武君 陈菁瑛（164）

杏果实成熟过程中*SPLs*基因的ABA响应特征与调控网络解析
…… 张钰婧 陈晨 苟宁宁 姜楠 乌云塔娜（174）
*ApGA20ox1*通过赤霉素代谢途径正向调控早花百子莲开花…… 岳建华 方婷婷 陈冠群 申晓辉（186）
黄芩*NAC*基因家族鉴定及干旱胁迫响应分析
…… 韩美光 孙英新 郝金鹏 耿兴雨 张海航 邸鹏 杨利民 程林（196）
转录组和代谢组联合分析蒙古黄芪茎表皮毛形成及其对药效成分积累的影响
…… 雷子莹 武延慧 赵生婷 张瑜 王嘉蕾 贺润丽 刘建霞 王瑞军（210）
日本落叶松*LkNiR*启动子的克隆及表达特性分析
…… 武郁洁 王宇倩 刘翠双 郁羽宵 耿静泽 盖颖（222）
贝莱斯芽胞杆菌MH24防控辣椒疫病及诱导辣椒转录组学的研究
…… 李瑾琪 姚经武 袁勤峰 刘瑜 曹春霞 尹飞虎 黄大野（230）
月季病原真菌鉴定及青岛假单胞菌BYX7生防潜力研究
…… 张愈甜 王怡 王子阳 付曼青 吴鹏宇（240）
基于ISSR分子标记和农艺性状的大球盖菇种质资源遗传多样性分析
…… 李诗琪 武月园 张殿朋 郭远 刘宇 宋忠娟 王守现 宋爽（252）
大蓟O-糖基转移酶*CjUGT10*功能表征及酶学特性 …… 陈影虹 曹先慧 易佩琴 詹若挺 马东明（263）
宏基因组来源高比活7α-羟基类固醇脱氢酶结构和功能表征
…… 刘雨婷 肖恩乐 龚雨霞 唐湘华 黄遵锡 许波（274）
基于代谢组学解析白酒糟双菌发酵单细胞蛋白的原料品质
…… 桂元 杨婷妃 王风青 刘军 刘根侨 李仲玄 廖钰婷 王川 李丽 周正富（283）
构建可利用酸解液表达外源蛋白的谷氨酸棒状杆菌工程菌
…… 樊子铭 邹宇 叶荣泰 白仲虎 刘秀霞（297）
基于Rep蛋白定向进化与高通量筛选提高rAAV产量…… 宋紫川 任和 莫婉婷 聂简琪 白仲虎（309）
重组人白细胞介素-27的表达、纯化及初步鉴定…… 任彦宵 温赛 谭天伟（318）
肠道菌群代谢产物TMAO介导氧化应激通路在腹泻发病中的作用机制
…… 方乐瑶 彭买姣 惠华英 谭周进（328）
耐冷耐碱反硝化细菌*Stutzerimonas stutzeri* 2B的脱氮特性及应用
…… 刘晋雅 张莹 张媛 车佳轩 郭艾英 秦保平 蔡爱军 郑会会（340）

（本期值班编辑 朱琳峰）

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
November **26**, **2026** Vol.**42** No. **11** (Serial No. **412**)

CONTENTS

Research Progress on Methyl Salicylate Esterase and Its Mediated Plant Disease Resistance
····· HOU Kun-peng XU Li-ping WANG Xing-bin et al (1)

Research Progress on Calmodulin-mediated Transcriptional Regulation Mechanisms in Plant Abiotic Stress Responses
····· CHANG Yu-qing DU Jia GUO Hang et al (11)

Mechanisms and Application Advances of *Beauveria bassiana* in Promoting Plant Growth
····· YE Xiao SUN Pei TONG Wen et al (24)

Research Progress in Cold-resistant Transcription Factors of *Hevea brasiliensis*
····· LIU Ni LI Chen-wan-li NIU Ying-feng et al (35)

Research Progress of AA9 Family Lytic Polysaccharide Monooxygenases
····· LI Cong YU Ru-yun ZHENG Fei et al (45)

Research Progress in *CD163* Gene Editing to Develop PRRSV-resistant Pigs
····· ZHAO Xin-yue ZENG Wei ZHANG Li-ping et al (58)

Application of Patient-derived Tumor Organoids in PROTAC Development
····· LIU Ya-qi LI Yao-xuan LIU Han-xiao et al (70)

Application Advances of CRISPR-Cas *Trans*-cleavage Technology in Multiplex Nucleic Acid Detection of Animal Pathogens
····· ZHANG Jin-shen YU Yong-tao QI Jiao-jiao et al (81)

OsTrxL1 Interacts with OsCYP89A2 to Cooperatively Regulate Drought Stress Responses in Rice
····· ZHONG Jiao REN Qiong FAN Zhao-rui et al (92)

QTL Mapping for Seed Coat Color in Soybean
····· LI Ya-qian FENG Long-zhe SUN Nan et al (103)

Genome-wide Identification of the *IbBADH* Gene Family and Screening of Upstream Transcriptional Regulators of *IbBADH1a* in Sweetpotato
····· ZHOU Guang-li CHEN Jin-chai LI Xin-xin et al (113)

Cloning and Functional Characterization of Cucumber *CsWRKY12* Gene in Drought Tolerance
····· LI Chang-yan XIA Kang-li WANG Meng et al (124)

Genome-wide Development of SSR Primers and Genetic Diversity Analysis in Blueberry
····· LIU Si-wen WANG Bo-wei XING Jin-jie et al (134)

Functional Analysis of Chrysanthemum *CmJAZ1* Gene in Negative Regulation of Drought Stress
····· LI Jia-qun ZHANG Yu-ting ZHANG Xin-yi et al (145)

Cloning and Freezing Tolerance Analysis of the *MsCZF29* Gene in Alfalfa
····· FAN Yu-xin REN Nai-peng XUAN Yi-fu et al (154)

Cloning and Expression Analysis of Glycosyltransferase Genes Involved in Gastrodin Biosynthesis in *Pholidota chinensis* Lindl.
····· LIU Bao-cai HU Xue-bo ZHAO Yun-qing et al (164)

ABA Response Characteristics and the Regulatory Network of *SPLs* during *Prunus armeniaca* Fruit Ripening
····· ZHANG Yu-jing CHEN Chen GOU Ning-ning et al (174)

BIOTECHNOLOGY BULLETIN
November **26, 2026** Vol.**42** No. **11** (Serial No. **412**)

ApGA20ox1 Positively Regulates Flowering of *Agapanthus praecox* via the Gibberellin Metabolic Pathway
····· YUE Jian-hua FANG Ting-ting CHEN Guan-qun et al (186)

Genome-wide Identification and Drought Stress Response Analysis of the *NAC* Gene Family in *Scutellaria baicalensis*
····· HAN Mei-guang SUN Ying-xin HAO Jin-peng et al (196)

Integrated Transcriptomic and Metabolomic Analysis Reveals the Mechanism Underlying Trichome Formation on the Stem Epidermis of *A. mongholicus* and Its Impact on Bioactive Compound Accumulation
····· LEI Zi-ying WU Yan-hui ZHAO Sheng-ting et al (210)

Cloning and Expression Characteristics Analysis of *LkNiR* Promoter from *Larix kaempferi*
····· WU Yu-jie WANG Yu-qian LIU Cui-shuang et al (222)

Control of Pepper Blight by *Bacillus velezensis* MH24 and Induction of Pepper Transcriptomic Responses
····· LI Jin-qi YAO Jing-wu YUAN Qin-feng et al (230)

Identification of Pathogenic Fungi on *Rosa chinensis* and Biocontrol Potential of *Pseudomonas qingdaonensis* BYX7
····· ZHANG Yu-tian WANG Yi WANG Zi-yang et al (240)

Genetic Diversity Analysis of *Stropharia rugosoannulata* Germplasm Resources Based on ISSR Markers and Agronomic Traits
····· LI Shi-qi WU Yue-yuan ZHANG Dian-peng et al (252)

Functional Characterization and Enzymatic Properties of the O-Glycosyltransferase *CjUGT10* from *Cirsium japonicum* Fisch. ex DC.
····· CHEN Ying-hong CAO Xian-hui YI Pei-qin et al (263)

A High-specific-activity 7α-hydroxysteroid Dehydrogenase from Metagenome: Structural and Functional Characterization
····· LIU Yu-ting XIAO En-le GONG Yu-xia et al (274)

Raw Material Quality Analysis of Single-cell Protein Production from Baijiu Distiller's Grains via Dual-strain Fermentation Based on Metabolomics
····· GUI Yuan YANG Ting-fei WANG Feng-qing et al (283)

Construction of Engineered *Corynebacterium glutamicum* for Heterologous Protein Expression Using Acid Hydrolysate
····· FAN Zi-ming ZOU Yu YE Rong-tai et al (297)

Enhancing rAAV Production through Directed Evolution and High-throughput Screening of Rep Protein
····· SONG Zi-chuan REN He MO Wan-ting et al (309)

Expression, Purification and Preliminary Identification of Recombinant Human Interleukin-27
····· REN Yan-xiao WEN Sai TAN Tian-wei (318)

Mechanism of the Oxidative Stress Pathway Mediated by the Gut Microbiota Metabolite TMAO in the Pathogenesis of Diarrhea
····· FANG Le-yao PENG Mai-jiao HUI Hua-ying et al (328)

Denitrification Characteristics and Application of Psychrotolerant and Alkali-tolerant Denitrifying Bacterium *Stutzerimonas stutzeri* Strain 2B
····· LIU Jin-ya ZHANG Ying ZHANG Yuan et al (340)

生物技术通报
· 综述与专论 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):1-10

水杨酸甲酯酶及其介导的植物抗病性研究进展

侯坤鹏[1] 徐莉萍[1] 王邢斌[1] 张雨晴[1] 王文强[1] 霍子函[1] 赵晨阳[1] 徐硕[1]
张智强[2*] 苟明月[1*]
（1.河南农业大学农学院,郑州 450046; 2.河南农业大学烟草学院,郑州 450046）

摘 要： 水杨酸甲酯酶属于α/β水解酶超家族，在植物免疫中发挥重要作用。本文系统综述了水杨酸甲酯酶在植物抗病领域的研究进展。首先，阐述了水杨酸甲酯酶的发现和生化功能，分析了该酶在不同植物中的进化与抗病性的关系。其次，重点综述了水杨酸甲酯酶抵御病毒、真菌、细菌、原生生物和寄生生物多类病原体的抗病功能和机制，阐释了其在植物局部防御和系统获得性抗性的作用机制，总结了该酶在参与植物间气传性免疫中发挥的重要作用。进一步从转录水平调控和翻译后修饰两个层面，介绍了转录因子对水杨酸甲酯酶基因的表达调控，以及去乙酰化修饰对酶活性的影响。此外，本文基于现代生物信息学技术和测序技术的发展，探讨了水杨酸甲酯酶基因资源的挖掘策略，并展望了其在抗病育种中的潜在应用价值，提出其在目前研究中有待解决的问题。本文为深入理解水杨酸甲酯酶介导的植物免疫调控机制及其未来研究方向提供理论参考，并为植物抗病品种的选育提供理论支撑。

关键词： 水杨酸甲酯酶；植物；抗病；系统获得性抗性；气传性免疫

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0194

Research Progress on Methyl Salicylate Esterase and Its Mediated Plant Disease Resistance

HOU Kun-peng[1] XU Li-ping[1] WANG Xing-bin[1] ZHANG Yu-qing[1] WANG Wen-qiang[1] HUO Zi-han[1]
ZHAO Chen-yang[1] XU Shuo[1] ZHANG Zhi-qiang[2*] GOU Ming-yue[1*]
(1. *College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou* 450046; 2. *College of Tobacco Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou* 450046)

Abstract: Methyl salicylate esterase is a member of the α/β hydrolase superfamily, which plays an important role in plant immunity. This review systematically summarizes the research progress on methyl salicylate esterase in the field of plant disease resistance. First, this review describes the discovery and biochemical functions of methyl salicylate esterase and analyzes the relationship between its evolution across different plant species and disease resistance. Second, the defense functions and mechanisms of methyl salicylate esterase against multiple classes of pathogens, including viruses, fungi, bacteria, protists, and parasitic organisms, are summarized. The mechanism of action of the esterase in both local defense and systemic acquired resistance is elucidated, and its important role in airborne immune communication among plants is described. Furthermore, from the perspectives of transcriptional regulation and post-translational modification, the regulation of methyl salicylate esterase genes expression by transcription factors, as well as the effect of deacetylation on enzyme activity, is summarized. Additionally, this review discusses strategies for mining methyl salicylate esterase gene resources, explores its potential applications in disease resistance breeding, and identifies unresolved questions in current research. This review provides theoretical references for in-depth understanding of the plant immune regulatory network mediated by methyl salicylate esterase and its future research directions, and offers theoretical support for the breeding of disease-resistant plant varieties.

Keywords: methyl salicylate esterase; plant; disease resistance; systemic acquired resistance; airborne defense

收稿日期：2026-02-08
基金项目：河南省科技研发计划联合基金（应用攻关类）项目（242103810021），河南省科技攻关项目（252102110264），河南省杰出青年科学基金滚动支持项目（252300421235）
*通信作者：张智强 xiao_qiang8866@163.com，苟明月 mingyuegou@henau.edu.cn

水杨酸甲酯酶（methyl salicylate esterase）是一类具有水杨酸甲酯酶催化活性的水解酶[1]，能将水杨酸甲酯（methyl salicylate, MeSA）转化为水杨酸（salicylic acid, SA），在植物抗病方面发挥非常重要的作用。SA作为一种重要的植物激素，参与调控植物SA代谢[2-3]，而MeSA是系统获得性抗性（systemic acquired resistance, SAR）的移动信号之一[4]。水杨酸甲酯酶在多种植物中被发现，并且响应SA信号通路[5-10]，参与调控植物抗病性。水杨酸甲酯酶可调控包括病毒、真菌、细菌以及原生生物和寄生生物在内的多种病原体的侵染，甚至参与气传性免疫（airborne defense, AD）[11]。近年来，研究发现水杨酸甲酯酶基因的表达受转录因子调控，其在翻译后修饰方面的研究也有新的进展。本文重点综述水杨酸甲酯酶在植物免疫中的功能和调控机制，并分析水杨酸甲酯酶在植物生产领域的潜在应用前景，为水杨酸甲酯酶基因的未来研究提供参考。

1 水杨酸甲酯酶的生化功能与进化分析

1.1 水杨酸甲酯酶的生化功能

水杨酸甲酯酶属于α/β水解酶超家族，蛋白结构中含有3个主要的酶催化活性位点：Ser、His和Asp/Glu，Ser与Asp/Glu和His形成氢键，3个氨基酸残基构成1个完整的催化三联体，形成1个活性位点[12]。水杨酸甲酯酶的水解底物为MeSA，在水解过程中，Ser的羟基对MeSA的羧基碳进行亲核攻击，使MeSA被水解为SA（图1），而SA会与Ala和His形成氢键，破坏催化三联体残基之间氢键的形成，由于活性位点无法同时结合SA和MeSA，因此SA会与MeSA竞争性地结合该酶，从而抑制该酶的活性[13]。水杨酸甲酯酶首次在烟草中被发现，由于其与SA有较高亲和力，所以被命名为水杨酸结合蛋白2（salicylic acid binding protein 2, SABP2）[1, 13]。

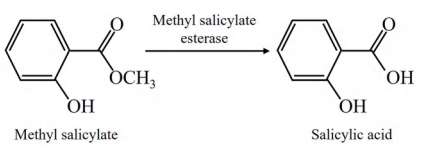


图1 水杨酸甲酯酶催化反应

Fig. 1 Methyl salicylate esterase-catalyzed reaction

1.2 植物水杨酸甲酯酶及其进化分析

为探究水杨酸甲酯酶在不同植物中的进化与抗病性的关系，将来自烟草（*Nicotiana tabacum*）、拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、甘蓝型油菜（*Brassica napus*）、马铃薯（*Solanum tuberosum*）、番茄（*Solanum lycopersicum*）、柑橘（*Citrus sinensis*）、桃（*Prunus persica*）、毛果杨（*Populus trichocarpa*）、大豆（*Glycine max*）、普通菜豆（*Phaseolus vulgaris*）、草莓（*Fragaria vesca*）和枸杞（*Lycium chinense*）的水杨酸甲酯酶的蛋白序列进行系统进化分析。拟南芥水杨酸甲酯酶蛋白序列来自拟南芥数据库（https://www.arabidopsis.org/），其余均来自NCBI数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）。分析结果显示，不同植物的水杨酸甲酯酶可分为4类（图2）。同属茄科的烟草NtSABP2[13]与番茄的StMES1-4[14]和枸杞的LcSABP2[15]聚为一类，其中NtSABP2可调控病毒引发的抗性；同属十字花科的甘蓝型油菜BnMES34[8]和马铃薯的StMES1[9]与拟南芥的其中3个水杨酸甲酯酶AtMES4/7/9[16]聚为一类，与拟南芥的AtMES1和AtMES2[16]不属于同一类，AtMES1/2/9对茉莉酸甲酯（methyl jasmonate，MeJA）、吲哚乙酸甲酯（methyl indole-3-aceticacid, MeIAA）、MeSA均具有酯酶活性，而AtMES4和AtMES7仅能水解MeSA和MeIAA；此外，只有*AtMES1/7/9*受细菌诱导表达，参与调控抗病性，暗示AtMESs在拟南芥中可能存在功能分化。同样，马铃薯和甘蓝型油菜的水杨酸甲酯酶参与调控不同类型病原物引发的抗性，功能也存在差异；来自柑橘的4个水杨酸甲酯酶CsMES1/CsSABP2-1、CsMES2[17]和CsSABP2-2、CsSABP2-3[5]与来自毛果杨的PtSABP2[18]和桃子的PpMES2[19]聚为一类，且柑橘水杨酸甲酯酶均参与调控细菌引发的抗病性，表明其功能在柑橘中高度保守；来自大豆的GmSABP2-1[6]与普通菜豆的PvMES1[10]和草莓的FvMES2[20]聚为一类，且PvMES1和FnMES2均参与真菌引发的抗病性，表明两者在抗病功能上具有紧密关联。因此，对水杨酸甲酯酶在不同植物间的系统进化分析，揭示了该酶在植物中的保守性和分化规律，为其生化功能及在植物抗病性中潜在作用的进一步研究提供了重要的线索。

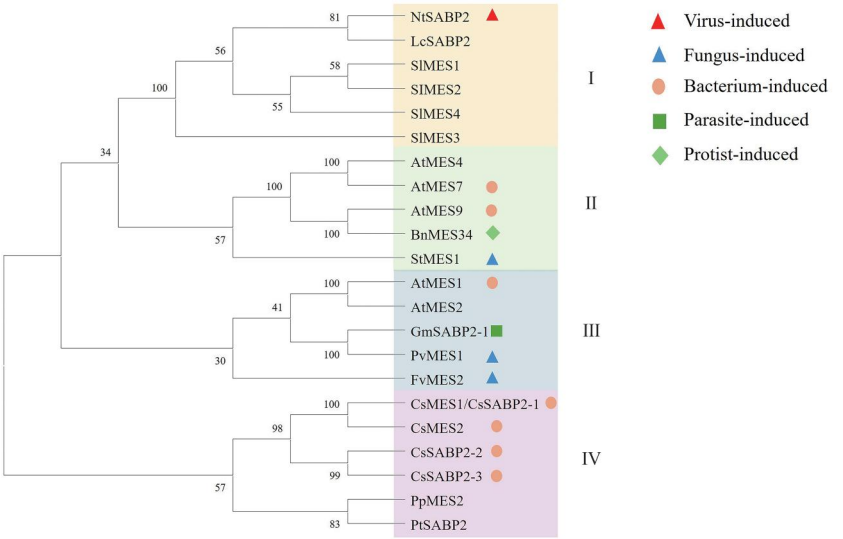


图2　已被研究报道具有水杨酸甲酯酶活性的水杨酸甲酯酶系统进化分析

Fig. 2　Phylogenetic analysis of the reported methyl salicylate esterase with methyl salicylate esterase activity

2　水杨酸甲酯酶参与植物抗病

水杨酸甲酯酶是植物SA信号通路中的关键代谢酶，其通过调控SA代谢来响应各种病原物对植物的侵染，从而激活免疫反应。此外该酶还可参与MeSA介导的植物间气传性免疫，负责MeSA这一植物间通讯信号的传递。

2.1　水杨酸甲酯酶基因调控病毒引发的抗性

水杨酸甲酯酶在病毒引发的抗性中发挥正向调控作用。烟草花叶病毒（TMV）侵染烟草，可诱导*NtSABP2*基因表达，而该基因一旦沉默，病毒蛋白TMV的积累量显著升高[21]，导致烟草的抗性减弱，研究表明*NtSABP2*对于TMV侵染后引发的植物抗性是必需的[1]。从机制上看，NtSABP2通过将MeSA转化为具有活性的SA，从而维持SA信号通路的正常转导，诱导病程相关基因（pathogenesis-related gene，*PR*）的表达。在*NtSABP2*沉默株系中，SA信号通路响应受阻，*PR1*基因表达被抑制，其表型与SA不敏感突变体*npr1*、*nim1*和*sai1*相似[22-24]，这3个突变体突变的是同一个基因*NPR1*，而NPR1是SA信号通路中的一个非常重要的信号转导蛋白，*NPR1*功能缺失会导致SA信号通路相关基因表达受损，从而损害植物抗病性，进一步证实NtSABP2通过协调MeSA与SA的代谢平衡，确保NPR1介导的防御反应正常启动，从而正向调控植物对病毒的抗性。因此，水杨酸甲酯酶是病毒引发的抗性中SA信号通路的关键调控因子。

2.2　水杨酸甲酯酶基因调控细菌引发的抗性

水杨酸甲酯酶可响应细菌侵染，赋予植物抗病性。拟南芥受到丁香假单胞菌番茄致病变种*P. syringae* pv. *tomato* DC3000（*Pst*）AvrRpm1侵染时，*AtMES1*、*ATMES7*、*ATMES9*基因表达水平升高，而这3个基因均能恢复*SABP2*沉默株系的抗病性[16]。柑橘的水杨酸甲酯酶基因*CsMES1/CsSABP2-1*正向调控对柑橘溃疡病（citrus canker）和黄龙病（Huanglongbing，HLB）的抗性[5, 17]，其过表达株系对溃疡病和黄龙病的抗性显著增强。但是，拟南芥和柑橘的水杨酸甲酯酶基因均具有功能冗余性。拟南芥该类基因的单个基因功能缺失后，抗性不受影响，只有当多个基因被沉默或敲除时，其抗性才被抑制，表现为SAR受损。柑橘黄单胞病菌（*Xanthomonas citri*）感染柑橘24 h后，*CsMES1/CsSABP2-1*的表达水平显著上调，*CsMES2*表达水平在感染48 h后显著上调，而*CsMES3*表达水平在感染24 h后却显著下调，因此，柑橘的水杨酸甲酯酶基因在受病原菌侵染后表达水平和时间均有所差异。此外，柑橘SA受体*NPR1*的表达水平在C型柑橘黄单胞杆菌（*Xanthomonas aurantifolii pathotype C*）感染后也上升，使SA含量升高，从而激发SAR[17]。过表达*CsMES1/*

CsSABP2-1 使转基因植物中SA含量增加，同时 *CsSAMT1* 表达水平升高，促进部分SA向MeSA的转化，使MeSA的含量增加，SA信号通路相关基因 *CsPR1*、*CsPR2* 和 *CsPR5* 的表达水平提高，从而激活SAR，提高柑橘对溃疡病和黄龙病的耐受性[5]。这表明 *CsMES1*/*CsSABP2-1* 可通过激活SAR增强植物抗性，且维持SA和MeSA之间的稳态，使柑橘具有广谱抗性。在这个过程中，过氧化氢含量的适度增加，促进了活性氧（reactive oxygen species, ROS）的积累[5]。因此，植物受到细菌侵染时，水杨酸甲酯酶基因表达水平升高，水杨酸甲酯酶活性提高，促进MeSA向SA的转化，使SA含量积累，激活SA信号通路 *PRs* 基因表达，引发植物产生SAR，且触发ROS爆发，进而引发植物产生抗性。

2.3 水杨酸甲酯酶基因调控真菌引发的抗性

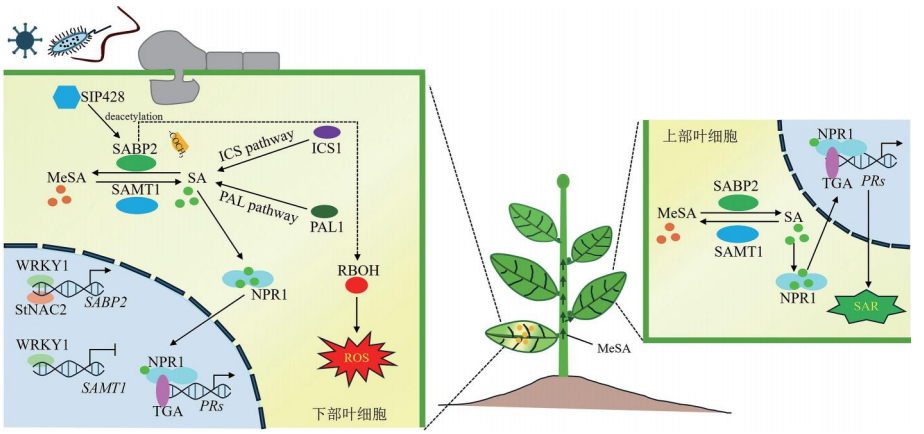
水杨酸甲酯酶参与真菌病原体入侵引起的免疫反应。植物受到真菌侵染后激发免疫信号转导途径，调节体内激素水平，使 *PRs* 基因表达上调，增强抗病性。在马铃薯中，水杨酸甲酯酶基因 *StMES1* 可正向调控马铃薯对晚疫病的抗性。致病疫霉（*Phytophthora infestans*）初次侵染马铃薯 *StMES1* 沉默株系的下部叶片后，未侵染的上部叶片中MeSA无法正常转化为SA，使 *PRs* 基因表达水平降低，导致植物SAR受损，证明马铃薯 *StMES1* 是诱发SAR的关键[9]。*StMES1* 同源基因 *StSABP2* 也可通过调节SA信号通路正向调控马铃薯对晚疫病的抗性。*StSABP2* 沉默株系对晚疫病的耐受性降低，SA含量减少，SA合成通路的相关基因 *StICS1* 和 *StPAL* 以及SAR相关基因 *StPR1*、*StPR5* 和 *StNPR1* 的转录水平显著下降；在烟草中瞬时表达 *StSABP2*，SA合成通路基因 *NbICS1*、*NbPAL* 以及SAR相关基因 *NbPR1*、*NbPR5* 和 *NbNPR1*、*NbNPR2* 表达水平升高[25]。菜豆的水杨酸甲酯酶PvMES1通过调控SA的合成，激活SA信号通路，从而诱导防御反应，抑制尖孢镰刀菌（*Fusarium oxysporum*）的侵染[10]。过表达 *PvMES1* 可激活苯丙氨酸合成、糖代谢和植物与病原体互作相关通路，促进菜豆木质素、果糖、葡萄糖、蔗糖和淀粉等物质的积累，同时SA信号通路 *TGA* 和 *PR1* 基因的表达显著上调，而沉默 *PvMES1* 导致上述通路相关基因表达下调，使植株更易感病。此外，*PvMES1* 通过抑制呼吸爆发氧化酶（respiratory burst oxidase homolog, RBOH）的表达，参与调控ROS爆发。在草莓中，*FvMES2* 调控真菌侵染植物引发的免疫反应[20]。*FvMES2* 在灰霉菌（*Botrytis cinerea*）感染过程中上调表达，过表达 *FvMES2* 并外施MeSA，可提高植株SA含量，诱导草莓对灰霉病的抗性。因此，水杨酸甲酯酶基因通过调控SA合成与信号通路，激活防御相关的代谢通路和 *PRs* 基因的表达，在植物对真菌病害的抗性中发挥正向调控作用。

2.4 水杨酸甲酯酶对其他病原物侵染的防御作用

水杨酸甲酯酶对原生生物和寄生动物侵染植物时引发的抗性也有关。在甘蓝型油菜中，水杨酸甲酯酶基因 *BnMES34* 在受到原生生物病原体——芸苔疟原虫（*Plasmodiophora brassica*）侵染时显著上调表达[8]。该基因与根肿病（crown gall）的发生密切相关，当在拟南芥中异源表达 *BnMES34* 时，转基因植株获得了对芸苔疟原虫侵染所引发的根肿病的抗性，表明 *BnMES34* 正向调控对芸苔疟原虫的抗性。此外，水杨酸甲酯酶也参与植物对线虫侵染的响应。研究发现，来自大豆的GmSABP2-1蛋白具有水杨酸甲酯酶活性[6]。在大豆胞囊线虫（soybean cyst nematode, SCN）侵染大豆的过程中，*GmSABP2-1* 被诱导表达，从而增强大豆对该线虫的抗性。过表达 *GmSABP2-1* 可显著减少大豆根部胞囊线虫的数量。*GmSABP2-1* 作为SAR的重要组成部分，接收MeSA信号，从而激发SAR。因此，水杨酸甲酯酶在植物抵御原生生物和寄生动物的侵染中同样发挥关键作用。其中 *BnMES34* 介导的对根肿病的抗性，以及 *GmSABP2-1* 参与的对线虫的SAR反应均依赖于水杨酸甲酯酶对MeSA信号的识别与转化，进而激活下游防御通路。

上述研究表明水杨酸甲酯酶基因在调控各种病原物侵染引发的抗病性中发挥重要作用，其参与调控的抗病性与SA信号通路密切相关。一方面，受病原物侵染部位的水杨酸甲酯酶，通过将MeSA转化为SA，同时激活异分支酸合成酶（isochorismate synthase, ICS）途径和苯丙氨酸解氨酶（phenyalanine ammonia-lyase, PAL）途径[26]，使 *ICS1* 和 *PAL1* 表达水平上升[27-28]，促进SA的合成，激活 *TGA* 表达，促进TGA转录因子与NPR1受体结合，进一步激活 *PRs* 基因的表达[29]，此外，水杨酸甲酯酶基因还参

与激活ROS爆发，使植物产生局部抗性；另一方面，水杨酸甲酯酶通过调控SA和MeSA之间的转化来调控SAR。受病原物侵染部位中的水杨酸甲基转移酶（salicylate methyltransferase, SAMT1）将SA甲基化为MeSA，使其作为长距离移动信号，从韧皮部运输至远端未侵染的组织[4]，随后，水杨酸甲酯酶将运输至未侵染组织的MeSA再转化为SA，在远端重新激活防御反应[30-31]，使植物产生SAR（图3）。



当病原物（真菌、细菌、病毒等）侵染植物下部叶片时，植物感知信号，激活SAMT1，将叶片中的SA转化为MeSA，*SABP2*受WRKY1和NAC2调控，同时SIP428对SABP2进行去乙酰化修饰，增强SABP2的水杨酸甲酯酶活性，促进MeSA向SA的转化，同时激活ICS途径和PAL途径，共同促进SA的积累，促进转录因子TGA与受体NPR1结合，激活*PRs*基因表达，且SABP2间接调控RBOH活性，刺激ROS爆发，使下部叶产生局部抗性，而WRKY1适当抑制*SAMT1*基因表达，调控MeSA和SA之间的动态平衡；当MeSA通过韧皮部运输至上部叶片时，随着上部叶片MeSA水平上升，SABP2被激活，重新将MeSA转化为SA，再次促进上部叶的转录因子TGA与NPR1结合，激活*PRs*基因表达，引发SAR。实线箭头表示直接调控，虚线箭头表示间接调控，T型线表示抑制作用

When pathogens (such as fungi, bacteria, viruses, etc.) infect the lower leaves of a plant, the plant perceives the signal and activates SAMT1, which converts SA in the leaves into MeSA. *SABP2* is regulated by WRKY1 and NAC2. Meanwhile, SIP428 deacetylates SABP2, enhancing its methyl salicylate esterase activity, which promotes the conversion of MeSA back to SA. This simultaneously activates the ICS pathway and the PAL pathway, collectively promoting the accumulation of SA. The accumulation of SA facilitates the binding of the transcription factor TGA with its receptor NPR1, activating the expression of *PRs* genes. Additionally, SABP2 indirectly regulates RBOH activity, stimulating the ROS, which induces local resistance in the lower leaves. Furthermore, WRKY1 moderately inhibits the expression of *SAMT1* gene, thereby regulating the dynamic balance between MeSA and SA. When MeSA is transported to the upper leaves via the phloem, the increased MeSA level in the upper leaves activates SABP2, which reconverts MeSA into SA. This again promotes the binding of TGA with NPR1 in the upper leaves, activates the expression of *PRs* genes, and triggers SAR. Solid arrows indicate direct regulation, dashed arrows indicate indirect regulation, T-shaped lines indicate inhibition

图3　水杨酸甲酯酶基因调节植物抗病性

Fig. 3　Methyl salicylate esterase gene regulates plant disease resistance

2.5　水杨酸甲酯酶参与植物的气传性免疫

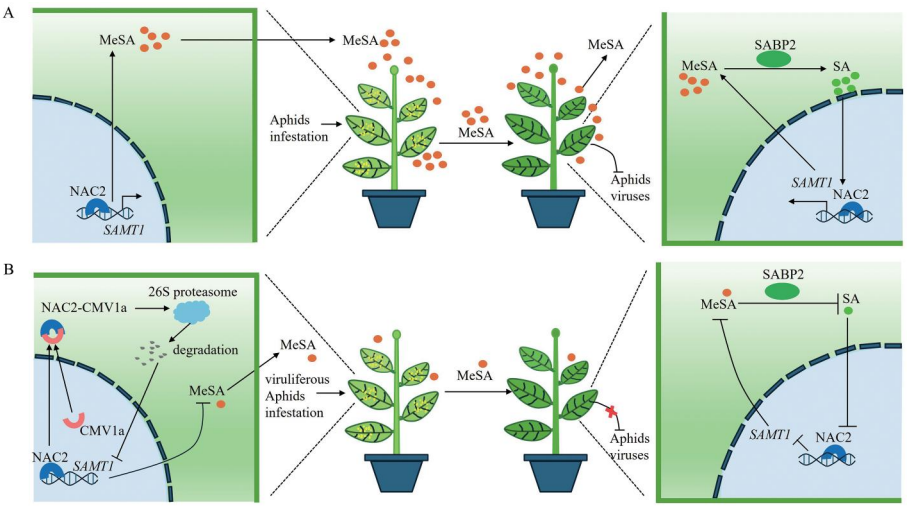
水杨酸甲酯酶基因对于植物间气传性免疫[32]的形成非常重要。早在1997年，研究发现当植物受到外界刺激时，植物释放的挥发性有机化合物（volatile organic compounds, VOCs）MeSA可作为植物间通讯的信号分子，介导植物间的气传性免疫[33-34]。近年来，研究发现烟草水杨酸甲酯酶SABP2作为邻近植物感知空气中MeSA的关键受体，负责将MeSA重新转化为具有生物活性的SA，同时启动和放大下游防御信号通路[11, 35-36]。在这个过程中，无毒蚜虫的侵染诱导植物合成大量MeSA并释放在空气中，其中转录因子NAC2可直接结合*SAMT1*的启动子并激活其表达，当邻近植物感知到空气中的MeSA，邻近植物的SABP2能将感知到的MeSA转化为SA，激活NAC2-SAMT1模块，促进MeSA合成，MeSA再次释放，促进更多的邻近植物SABP2感知MeSA，从而在植物间建立起气传性免疫这一群体防御。因此，形成一条“MeSA →SABP2 →SA →NAC2 →SAMT1 →MeSA”构成的正反馈信号通路，其中，水杨酸甲酯酶SBAP2既是MeSA的受体，也是该通路的启动开关（图4-A）。但蚜虫进化出的一种反防御机制会抵抗植物间的气传性免疫。携带黄瓜花叶病毒（CMV）的蚜虫侵染植物时会抑制植物间的信息交流，使邻近植物无法产

生气传性免疫。CMV病毒复制酶的关键组分CMV1a蛋白，与NAC2发生互作，促使NAC2从细胞核中输出，并由26S蛋白酶体降解，负调控NAC2-SAMT1模块，抑制MeSA的合成与释放，从而切断植物间通讯，促进蚜虫与病毒对邻近植物的侵染（图4-B）。该反防御机制进一步印证了SABP2作为MeSA受体，负责信号接受与传递的重要性，一旦上游MeSA合成被阻断，SABP2便无法激活邻近植物的防御功能。水杨酸甲酯酶在气传性免疫中参与MeSA介导的植物间气传性免疫信号通路，在该通路中既是MeSA受体，也是信号传递和转化的关键。

3 水杨酸甲酯酶的调控研究现状

3.1 水杨酸甲酯酶基因表达水平的调控

水杨酸甲酯酶基因可被多种病原物诱导表达，包括病毒、细菌、真菌以及原生生物和寄生动物等（表1）。当植物感知到病原物入侵信号时，会激活相应的调控机制，募集转录因子以增强水杨酸甲酯酶基因的转录活性。在调控水杨酸甲酯酶基因表达的转录因子中，NAC家族成员发挥了重要作用。NAC是一类植物特有的转录因子，由高度保守的N端结构域和可变的C端转录调控区组成，参与激素水平的调节以及生物和非生物胁迫的调控[37]。马铃薯中的StNAC2可直接结合*StSABP2*的上游启动子，增强*StSABP2*的转录活性，提高对马铃薯致病疫霉的抗性[25]（图3）。同样，在植物对蚜虫的防御中，NAC2可激活*SAMT1*的表达，促进MeSA的合成，诱导对蚜虫的免疫并减少病毒传播[11]。在此过程中，SABP2作为SA信号级联反应的关键组分，与NAC形成“NAC2-SABP2”调控模块，通过调控SA信号通路，调控植物抗病性。此外，WRKY转录因子也参与水杨酸甲酯酶基因的表达调控。WRKY转录因子通过结合靶基因启动子中的特定DNA序列W-box来



A：当无病毒蚜虫侵染植物时，NAC2转录因子被激活，使*SAMT1*表达水平上升，激活SAMT1，强烈诱导MeSA的生成，随着MeSA大量释放到空气中，邻近植物捕获MeSA，激活SABP2，将MeSA转化为SA，激活NAC2-SAMT1模块，进一步促进MeSA的生成，使邻近植物产生气传性免疫（AD），抵御蚜虫的侵染。B：当携带病毒的蚜虫侵染植物时，NAC2与CMV1a结合，被26S蛋白酶体降解，抑制SAMT1，从而抑制MeSA的生成，邻近植物捕获到的MeSA减少，抑制SABP2活性，使SA生成减少，抑制NAC2-SAMT1模块，从而抑制MeSA的合成和释放，降低对蚜虫的抗性。实线箭头表示直接调控，T型线表示抑制作用

A: When non-virulent aphids infest a plant, the NAC2 transcription factor is activated, leading to increased expression of *SAMT1* and activation of SAMT1, which strongly induces MeSA production. As substantial amounts of MeSA are released into the air, neighboring plants capture MeSA, activate SABP2, and convert MeSA into SA, thereby activating the NAC2-SAMT1 module and further promoting MeSA generation. This induces airborne defense (AD) in neighboring plants, protecting them against aphid infestation. B: When viruliferous aphids infest a plant, NAC2 binds to CMV1a and is degraded by the 26S proteasome, leading to inhibition of SAMT1 and subsequent suppression of MeSA production. Consequently, less MeSA is captured by neighboring plants, SABP2 activity is inhibited, and SA production is reduced. This suppresses the NAC2-SAMT1 module, inhibiting MeSA synthesis and release, thereby reducing resistance to aphids. Solid arrows indicate direct regulation, T-shaped lines indicate inhibition

图4 水杨酸甲酯酶参与MeSA介导的植物气传性免疫

Fig. 4 Methyl salicylate esterase plays a key role in MeSA-mediated airborne defense in plants

表1　水杨酸甲酯酶基因受病原物诱导及其抗病功能

Table 1　Pathogen-induced expression and disease resistance function of methyl salicylate esterase genes

基因 Genes	物种 Species	是否受病原物诱导 Whether induced by pathogens or not	病原物种类 Types of pathogens	遗传材料的表型 The phenotype of genetic material	参考文献 References
NtSABP2	烟草 *Nicotiana tabacum*	是	病毒	*NtSABP2*沉默株系相较于野生型更易感烟草花叶病毒	[1, 13]
AtMES1 *AtMES7* *AtMES9*	拟南芥 *Arabidopsis thaliana*	是	细菌	*SABP2*沉默系更易感丁香假单胞菌，*AtMES1*、*AtMES7* 和 *AtMES9* 这3个基因能完全恢复 *SABP2* 沉默系的SAR缺陷	[16]
AtMES2		否			
AtMES4		否			
CsMES1 *CsMES2*	柑橘 *Citrus sinensis*	是	细菌	外施MeSA和SA后，野生型叶片的柑橘溃疡病菌明显减少	[17]
CsSABP2-1 *CsSABP2-2* *CsSABP2-3*		是	细菌	*CsSABP2*过表达株系相对于野生型，对柑橘溃疡病和黄龙病的抗性提高	[5]
StMES1	马铃薯 *Solanum tuberosum*	是	真菌	*StMES1*沉默株系对致病疫霉的抗性相对于野生型减弱	[9]
PvMES1	普通菜豆 *Phaseolus vulgaris*	是	真菌	*PvMES1*的过表达株系提高了对尖孢镰刀菌的抗性，*PvMES1*的沉默株系更加易感病	[10]
FvMES2	草莓 *Fragaria vesca*	是	真菌	*FvMES2*的过表达株系增加对灰霉病的抗性	[20]
BnMES34	甘蓝型油菜 *Brassica napus*	是	原生动物	*BnMES34*过表达株系有效抵御芸苔疟原虫的侵袭	[8]
GmSABP2-1	大豆 *Glycine max*	是	动物	*GmSABP2-1*的过表达株系能有效抵抗大豆胞囊线虫	[6]
SlMES1 *SlMES2* *SlMES3* *SlMES4*	番茄 *Solanum lycopersicum*	未知			[14]
PtSABP2	毛果杨 *Populus trichocarpa*	未知			[18]
PpMES2	桃子 *Prunus persica*	未知			[19]
LcSABP2	枸杞 *Lycium chinense*	未知			[15]

调控转录[38]。苹果WRKY1[39]通过正向调控*SABP2*的表达，促进邻近植物将捕获的MeSA转化为SA，同时WRKY1负向调控*SAMT1*，抑制其活性，阻止部分SA转化为MeSA，从而维持邻近植物体内SA的稳态（图3），增强对白粉病（Mulberry powdery mildew）的抗性。因此，水杨酸甲酯酶基因的表达受多种转录因子的调控。NAC家族和WRKY家族转录因子均通过调控水杨酸甲酯酶基因，调节水杨酸甲酯酶的活性，控制SA和MeSA间的转化平衡，精细调控SA信号通路，进而能够适度地激活水杨酸甲酯酶介导的植物免疫反应。

3.2　水杨酸甲酯酶的翻译后修饰

关于水杨酸甲酯酶翻译后修饰的研究较少。在烟草中发现与SABP2互作的蛋白SIP428[40]是一种SIR2型脱乙酰化酶，组蛋白去乙酰化酶已被证明参与植物胁迫反应[41]。在TMV感染烟草时，*SIP428*的表达水平适度下调。功能研究表明，SIP428通过对SABP2进行去乙酰化修饰，增加SABP2的水杨酸甲酯酶活性（图3）。尽管目前关于水杨酸甲酯酶蛋白水平调控的研究报道相对有限，但现有研究表明，水杨酸甲酯酶通过翻译后修饰调控其活性。

4 抗病相关水杨酸甲酯酶基因的挖掘和应用

4.1 自然变异中挖掘水杨酸甲酯酶功能基因

随着测序技术的发展，全基因组关联分析（GWAS）被广泛应用于植物功能基因的挖掘，因此可通过GWAS挖掘自然变异中有水杨酸甲酯酶活性的基因。研究发现，对番茄体内MeSA水平进行GWAS分析，得到2个与水杨酸甲酯水平高度相关的位点，其中位于2号染色体的一个数量性状位点（quantitative trait loci，QTL）与低水平的MeSA相关，该位点有4个基因*SlMES1-4*被注释为水杨酸甲酯酶[14]。将4个基因通过原核表达系统获取纯化蛋白，以MeSA为底物进行反应，通过高效液相色谱-质谱联用（high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS）和气相色谱-质谱联用（gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS）检测剩余SA和MeSA水平，确定具有水杨酸甲酯酶活性。因此可以利用HPLC-MS和GC-MS高通量检测自然群体中SA和MeSA含量，对SA和MeSA含量进行GWAS或候选基因关联分析，挖掘水杨酸甲酯酶基因，进行抗病性鉴定和抗病机制解析，为抗病候选基因的选用提供理论基础。

4.2 反向遗传学挖掘水杨酸甲酯酶基因

已有研究利用反向遗传学手段以及生物信息学技术，通过比对水杨酸甲酯酶蛋白序列，筛选出候选水杨酸甲酯酶基因后，通过下面2种方式验证其功能，一是通过体外酶活实验，验证候选基因的水杨酸甲酯酶功能。基于拟南芥18个MES蛋白序列，在甘蓝型油菜中鉴定出44个MES家族基因，对候选基因*BnMES34*进行原核表达与蛋白纯化后的酶活分析表明，该基因编码的蛋白具有水杨酸甲酯酶活性[8]。二是将筛选到的候选基因，通过基因功能缺失和基因沉默材料，研究其具体的生物学功能。基于烟草NtSABP2蛋白序列在拟南芥鉴定出20个具有水杨酸甲酯酶活性蛋白的基因[16]，*AtMES1*、*ATMES7*、*ATMES9*的敲除株系感丁香假单胞菌，而这3个基因能恢复*SABP2*沉默株系的SAR缺陷。随着基因组学的发展，利用生物信息学技术能挖掘潜在的水杨酸甲酯酶基因。

4.3 水杨酸甲酯酶基因在植物抗病性中的应用

水杨酸甲酯酶与植物抗病性密切相关。NAC2和WRKY1通过调控*SABP2*，增强SABP2酯酶活性[25, 39]，促进MeSA向SA的转化，进而激活SA通路，提高抗病性。将这类转录因子导入植物中，会增加植物体内SA含量，强烈激发SAR，增强对各种病原菌的抵抗，可为植物广谱抗性育种提供一种理念。另有研究表明外源施加MeSA可增强SABP2酯酶活性，提高马铃薯对晚疫病的抗性[25]，MeSA能够提高邻近植物的AD[11, 35]，因此可以开发一种能够应用于田间的MeSA挥发装置或技术，提升植物体内的MeSA水平，诱发SAR和AD，以抵抗病虫害对作物的损害。水杨酸甲酯酶蛋白水平的修饰，对于水杨酸甲酯酶的活性也有影响。SIP428作为一种脱乙酰化酶对SABP2进行去乙酰化修饰[40]，使SABP2的酯酶活性得到提升。因此，构建*SIP428*的过表达植株能够提升水杨酸甲酯酶的活性，增强植物对病原物的抗性，进一步抵御病原物的入侵，为培育优良的抗病品种提供参考。

5 总结和展望

水杨酸甲酯酶是一类将MeSA转化为SA的水解酶，可调控植物体内MeSA和SA之间的动态平衡。近年来受作物种植和耕作制度以及全球气候变化的影响，作物多种病害混发的现象加重，对作物生产造成严重的损失。该酶可调控多种病原体侵染植物时引发的抗性，还参与植物的气传性免疫，具有广谱抗病性的潜力。因此，水杨酸甲酯酶基因的挖掘显得尤为重要。近年来通过GWAS技术和反向遗传学手段在多种植物中挖掘到水杨酸甲酯酶基因，未来有望在更多植物中挖掘具有水杨酸甲酯酶活性的基因，为分子抗病育种提供可能的基因资源。尽管目前对水杨酸甲酯酶基因调控植物抗病性的研究已较为丰富，但仍存在以下几个问题。

（1）水杨酸甲酯酶基因转录水平的调控仍有待研究。目前，关于水杨酸甲酯酶基因转录水平的调控研究较少。水杨酸甲酯酶基因受各种病原物诱导表达，证明该基因存在复杂的转录调控，研究证明，在烟草和柑橘中，水杨酸甲酯酶基因表达水平受转录因子调控[25, 39]，影响植物抗病性，但在其他植物中，水杨酸甲酯酶基因是否受转录因子调控仍有待发掘，且具体转录调控的分子机制也有待进一步解析。此外，植物体内是否存在负调控因子来减弱

水杨酸甲酯酶活性，也有待研究。因此，通过筛选与水杨酸甲酯酶基因互作的转录因子，并进行功能验证，解析其调控抗病性的机制非常重要。

（2）水杨酸甲酯酶翻译后修饰对植物抗病性调控的意义。关于水杨酸甲酯酶翻译后修饰及其对抗病性调控的研究尚不深入。SIP428对水杨酸甲酯酶进行去乙酰化修饰，可增强水杨酸甲酯酶活性[40]，但其互作机制未被解析，水杨酸甲酯酶本身可能以一种乙酰化的状态存在，植物体内是否有控制其乙酰化的“开关”，影响其酯酶活性？SIP428对水杨酸甲酯酶去乙酰化修饰后，对水杨酸甲酯酶基因的抗病性有何影响仍不清楚。此外，植物体内水杨酸甲酯酶是否还存在其他的翻译后修饰也有待研究。

（3）植物如何进行MeSA和SA之间动态平衡的精细调控，以实现信号的精准传递？MeSA和SA之间的信号转导调控机制尚不完全清楚。在柑橘中，水杨酸甲酯酶基因参与维持MeSA和SA的动态平衡[5]。过表达*CsSABP2*可上调*CsSAMT1*的表达，从而同时促进植物体内SA和MeSA的积累，但MeSA和SA如何在体内实现平衡，*CsSABP2*和*CsSAMT1*如何实现精准调控，使免疫信号精准传递，当植物完成免疫后该信号如何刹车，均需要进一步解析，这对于完善SA介导的抗病信号通路具有重要意义。

参考文献

[1] Kumar D, Klessig DF. High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(26): 16101-16106.

[2] Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease [J]. Annu Rev Phytopathol, 2009, 47: 177-206.

[3] Sharma S, Prasad M. Diverse roles of phytohormonal signaling in modulating plant-virus interactions [J]. J Exp Bot, 2025, 76(7): 1921-1940.

[4] Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, et al. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance [J]. Science, 2007, 318(5847): 113-116.

[5] Dong LT, Chen S, Shang LY, et al. Overexpressing CsSABP2 enhances tolerance to Huanglongbing and Citrus canker in *C. sinensis* [J]. Front Plant Sci, 2024, 15: 1472155.

[6] Lin JY, Wang WJ, Mazarei M, et al. GmSABP2-1 encodes methyl salicylate esterase and functions in soybean defense against soybean cyst nematode [J]. Plant Cell Rep, 2024, 43(6): 138.

[7] Soares JM, Weber KC, Qiu WM, et al. Overexpression of the salicylic acid binding protein 2 (SABP2) from tobacco enhances tolerance against Huanglongbing in transgenic *Citrus* [J]. Plant Cell Rep, 2022, 41(12): 2305-2320.

[8] Jia RM, Yu LG, Chen J, et al. Molecular evolution of methylesterase family genes and the BnMES34 is a positive regulator of *Plasmodiophora brassicae* stress response in *Arabidopsis* [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 260: 129333.

[9] Manosalva PM, Park SW, Forouhar F, et al. *Methyl esterase 1* (*StMES1*) is required for systemic acquired resistance in potato [J]. Mol Plant Microbe Interac, 2010, 23(9): 1151-1163.

[10] Xue RF, Feng M, Chen J, et al. A methyl esterase 1 (PvMES1) promotes the salicylic acid pathway and enhances *Fusarium* wilt resistance in common beans [J]. Theor Appl Genet, 2021, 134(8): 2379-2398.

[11] Gong Q, Wang YJ, He LF, et al. Molecular basis of methyl-salicylate-mediated plant airborne defence [J]. Nature, 2023, 622(7981): 139-148.

[12] Nardini M, Dijkstra BW. α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing [J]. Curr Opin Struct Biol, 1999, 9(6): 732-737.

[13] Forouhar F, Yang Y, Kumar D, et al. Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(5): 1773-1778.

[14] Frick EM, Sapkota M, Pereira L, et al. A family of methyl esterases converts methyl salicylate to salicylic acid in ripening tomato fruit [J]. Plant Physiol, 2023, 191(1): 110-124.

[15] Li Q, Wang G, Guan CF, et al. Overexpression of *LcSABP*, an orthologous gene for salicylic acid binding protein 2, enhances drought stress tolerance in transgenic tobacco [J]. Front Plant Sci, 2019, 10: 200.

[16] Vlot AC, Liu PP, Cameron RK, et al. Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 2008, 56(3): 445-456.

[17] de Lima Silva CC, Shimo HM, de Felício R, et al. Structure-function relationship of a *Citrus* salicylate methylesterase and role of salicylic acid in *Citrus* canker resistance [J]. Sci Rep, 2019, 9: 3901.

[18] Zhao N, Guan J, Forouhar F, et al. Two poplar methyl salicylate esterases display comparable biochemical properties but divergent expression patterns [J]. Phytochemistry, 2009, 70(1): 32-39.

[19] Cao XM, Duan WY, Wei CY, et al. Genome-wide identification and functional analysis of carboxylesterase and methylesterase gene families in peach (*Prunus persica* L. batsch) [J]. Front Plant Sci, 2019, 10: 1511.

[20] Jia RM, Xing KY, Tian L, et al. Analysis of methylesterase gene family in *Fragaria vesca* unveils novel insights into the role of FvMES2 in methyl salicylate-mediated resistance against strawberry gray mold [J]. J Agric Food Chem, 2024, 72(20): 11392-11404.

[21] Kopertekh L. Improving transient expression in *N. benthamiana* by suppression of the *Nb-SABP2* and *Nb-COI1* plant defence response related genes [J]. Front Plant Sci, 2024, 15: 1453930.

[22] Delaney TP, Friedrich L, Ryals JA. *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(14): 6602-6606.

[23] Glazebrook J, Rogers EE, Ausubel FM. Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening [J]. Genetics, 1996, 143(2): 973-982.

[24] Cao H, Bowling SA, Gordon AS, et al. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance [J]. Plant Cell, 1994: 1583-1592.

[25] Yan J, Li Q, Geng DY, et al. The potato StNAC2-StSABP2 module enhanced resistance to *Phytophthora infestans* through activating the salicylic acid pathway [J]. Mol Plant Pathol, 2025, 26(5): e70081.

[26] Lefevere H, Bauters L, Gheysen G. Salicylic acid biosynthesis in plants [J]. Front Plant Sci, 2020, 11: 338.

[27] Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, et al. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence [J]. Nature, 2001, 414(6863): 562-565.

[28] Mauch-Mani B, Slusarenko AJ. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica* [J]. Plant Cell, 1996: 203-212.

[29] Zou XP, Zhao K, Liu YN, et al. Overexpression of salicylic acid carboxyl methyltransferase (CsSAMT1) enhances tolerance to Huanglongbing disease in wanjincheng orange (*Citrus sinensis* (L.) osbeck) [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(6): 2803.

[30] Li YX, Zhang W, Dong HX, et al. Salicylic acid in *Populus tomentosa* is a remote signalling molecule induced by *Botryosphaeria dothidea* infection [J]. Sci Rep, 2018, 8: 14059.

[31] Dong HX, Zhang W, Li YX, et al. Overexpression of salicylic acid methyltransferase reduces salicylic acid-mediated pathogen resistance in poplar [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 973305.

[32] 袁亮, 郭慧娟, 孙玉诚, 等. 蚜虫诱导的植物免疫反应 [J]. 应用昆虫学报, 2015, 52(1): 23-31.
Yuan L, Guo HJ, Sun YC, et al. Plant immunity responses to aphid [J]. Chin J Appl Entomol, 2015, 52(1): 23-31.

[33] Baldwin IT, Halitschke R, Paschold A, et al. Volatile signaling in plant-plant interactions: "talking trees" in the genomics era [J]. Science, 2006, 311(5762): 812-815.

[34] Shulaev V, Silverman P, Raskin I. Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance [J]. Nature, 1997, 385 (6618): 718-721.

[35] Mahmood MA, Awan MJA, Naqvi RZ, et al. Methyl-salicylate (MeSA)-mediated airborne defence [J]. Trends Plant Sci, 2024, 29 (4): 391-393.

[36] 袁民航, 辛秀芳. 烽火狼烟: 水杨酸甲酯介导的植物间通讯和气传性免疫的机制解析 [J]. 植物学报, 2023, 58(5): 682-686.
Yuan MH, Xin XF. Study uncovers a new signaling circuit mediating airborne defense of plants against aphids and viruses [J]. Chin Bull Bot, 2023, 58(5): 682-686.

[37] Ooka H. Comprehensive analysis of *NAC* family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* [J]. DNA Res, 2003, 10(6): 239-247.

[38] Yang PZ, Chen ZX. A family of dispersed repetitive DNA sequences in tobacco contain clusters of W-box elements recognized by pathogen-induced WRKY DNA-binding proteins [J]. Plant Sci, 2001, 161(4): 655-664.

[39] Lan LM, Zhang LL, Cao LF, et al. WRKY1-mediated interconversion of MeSA and SA in neighbouring apple plants enhances defence against powdery mildew [J]. Plant Cell Environ, 2025, 48(5): 3105-3117.

[40] Haq MI, Thakuri BKC, Hobbs T, et al. Tobacco SABP2-interacting protein SIP428 is a SIR2 type deacetylase [J]. Plant Physiol Biochem, 2020, 152: 72-80.

[41] Nicolas-Francès V, Grandperret V, Liegard B, et al. Evolutionary diversification of type-2 HDAC structure, function and regulation in *Nicotiana tabacum* [J]. Plant Sci, 2018, 269: 66-74.

(责任编辑 张婷婷)

生物技术通报
· 综述与专论 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):11-23

钙调蛋白介导的转录调控机制在植物非生物胁迫中的研究进展

常宇晴 杜佳 郭杭 徐静 王一帆 汪尚 杜立群 曾后清*
（杭州师范大学生命与环境科学学院，杭州 311121）

摘 要： 植物整个生长周期遭受干旱、盐碱、高低温、金属毒害等非生物胁迫，严重限制作物生长发育与产量形成。为适应各种逆境，植物进化出精密的钙信号转导网络，通过动态调控逆境应答基因表达提高对逆境的适应性。钙调素（CaM）与类钙调蛋白（CML）是植物核心钙信号解码器，通过结合并调控下游靶蛋白活性，在非生物胁迫应答中发挥核心调控作用。逆境刺激触发胞质特异性Ca^{2+}信号，CaM/CML感知信号后通过与CAMTA、CBP60、WRKYIId、MYB、NAC、bZIP等多类转录因子结合，介导全基因组转录重编程，进而调控抗氧化系统、离子稳态、激素信号等通路，赋予植物逆境耐受性。本文系统总结了CaM/CML结合型转录因子的结构特征与功能特性，阐述CaM/CML介导的转录调控在通用胁迫、低温、高温、盐胁迫、干旱及金属离子等胁迫中的分子机制，归纳不同胁迫下CaM/CML信号通路的保守性与物种特异性，解析其与脱落酸、水杨酸、茉莉酸等植物激素信号的交叉互作网络。此外，提出了该研究领域在CaM/CML与转录因子结合特异性、液-液相分离功能、多重胁迫交叉应答等方面的关键科学问题，展望了单细胞测序、多组学整合、CRISPR/Cas9基因编辑等技术在解析调控网络与作物抗逆改良中的应用前景。深入阐明CaM/CML介导的转录调控机制，为作物抗逆分子育种提供理论依据与核心基因靶点，对培育气候智能型作物、推动农业绿色可持续发展具有重要科学价值与实践意义。

关键词： 钙信号；钙调素；类钙调蛋白；胁迫响应；转录因子；转录调控
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0123

Research Progress on Calmodulin-mediated Transcriptional Regulation Mechanisms in Plant Abiotic Stress Responses

CHANG Yu-qing DU Jia GUO Hang XU Jing WANG Yi-fan WANG Shang DU Li-qun ZENG Hou-qing*
(*College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou* 311121)

Abstract: Plants are continuously subjected to multiple abiotic stresses throughout their whole life cycle, including drought, salinity, extreme low/high temperature, and metal toxicity, which severely constrain crop growth, development and yield formation. To adapt to variable adverse environments, plants have evolved sophisticated calcium signal transduction networks that enhance stress adaptability by dynamically regulating the expression of stress-responsive genes. Calmodulin (CaM) and calmodulin-like proteins (CMLs) serve as the core calcium signal decoders in plants. They play central regulatory roles in abiotic stress responses by binding to downstream target proteins and modulating their activities. Stress stimuli trigger specific cytosolic Ca^{2+} signatures; after perceiving these Ca^{2+} signals, CaM/CML proteins interact with diverse transcription factors such as CAMTA, CBP60, Group IId WRKY, MYB, NAC and bZIP. This interaction mediates genome-wide transcriptional reprogramming, further regulating pathways involving antioxidant systems, ion homeostasis and hormone signaling, and ultimately conferring stress tolerance in plants. This review systematically summarizes the structural and functional characteristics of CaM/CML-binding transcription factors, with an emphasis on the molecular mechanisms of CaM/CML-mediated transcriptional regulation in general stress responses, as well as under cold, heat, salt, drought, and metal ion stress conditions. We also summarize the conservation and species-

收稿日期：2026-01-27
基金项目：国家自然科学基金项目（32372802），浙江省教育厅一般科研项目（Y202454803）
*通信作者：曾后清 zenghq@hznu.edu.cn

specificity of CaM/CML signaling pathways under different stresses, and dissect the crosstalk regulatory networks between CaM/CML signaling and phytohormone signals including abscisic acid, salicylic acid, and jasmonic acid. In addition, we propose key scientific challenges in this research field, covering the binding specificity of CaM/CML with transcription factors, the function of liquid-liquid phase separation, and the crosstalk response to multiple combined stresses. We further explore the application potential of single-cell sequencing, multi-omics integration and CRISPR/Cas9 gene editing technology in deciphering regulatory networks and improving crop stress resistance. In-depth clarification of CaM/CML-mediated transcriptional regulatory mechanisms can provide a theoretical basis and core gene targets for molecular breeding of stress-tolerant crops, and is of great scientific value and practical significance for breeding climate-smart crops and advancing green sustainable agricultural development.

Keywords: Calcium signaling; Calmodulin; Calmodulin-like proteins; stress response; transcription factor; transcriptional regulation

高等植物在其整个生命周期中面临多种环境胁迫，例如干旱、盐碱、高温、低温、营养缺乏和病虫害侵袭等。这些环境胁迫对农业生产构成严重威胁[1]。植物具有感知及应对各种胁迫的能力，这对其在多变且常为不利的环境中的适应与生存至关重要[2]。钙离子（Ca^{2+}）作为重要的第二信使，在调控植物生长、发育和逆境响应中发挥着重要作用。由于细胞内高浓度的Ca^{2+}易与磷酸盐结合形成不溶性沉淀，并可与核酸等大分子结合产生细胞毒性，胞质游离Ca^{2+}维持在极低水平（约100–200 nmol/L）。细胞内外存在显著的Ca^{2+}浓度梯度（胞外为1–10 mmol/L，胞质静息态浓度仅为100–200 nmol/L），这为胞质Ca^{2+}水平的快速动态变化提供了基础[3]。Ca^{2+}动态变化主要由Ca^{2+}转运蛋白（包括Ca^{2+}通道、Ca^{2+}泵及Ca^{2+}/H^{+}反向转运蛋白）以及细胞内Ca^{2+}储存库（如内质网、线粒体、叶绿体和液泡）共同调节[3]。许多外界的刺激可以引起细胞内Ca^{2+}浓度的瞬时变化，而且不同刺激引发的Ca^{2+}浓度瞬变在振幅、持续时间、频率和细胞内空间分布上各不相同。这种由刺激引起的特异性的Ca^{2+}浓度瞬变被称为Ca^{2+}信号特征（Ca^{2+} signature）[3]。在真核生物中，含有EF手型结构域的蛋白质可作为Ca^{2+}感受蛋白，其通过结合Ca^{2+}并发生构象上的变化，从而转导Ca^{2+}信号。植物中Ca^{2+}感受蛋白，主要包括钙调素（calmodulin, CaM）及类钙调蛋白（calmodulin-like protein, CML）、钙依赖型蛋白激酶（calcium-dependent protein kinase, CDPK）以及钙调磷酸酶B样蛋白（calcineurin B-like protein, CBL）。在这些蛋白中，CaM、CML和CBL本身没有催化活性，需要通过下游效应蛋白来发挥功能，属于Ca^{2+}信号传导中的中继蛋白；CDPK具有激酶结构域，属于Ca^{2+}信号传导中的应答蛋白[4]。

CaM是一种广泛存在于真核生物中的高度保守的蛋白质。CaM通常由148个氨基酸组成，包含2对共4个EF手型结构域，每个EF手型结构域包含2个α螺旋，二者之间通过一个由12个氨基酸残基组成的环状结构相连[5]。两对EF手型结构域分别位于分子两端，可稳定地结合Ca^{2+}，中间则通过一段α螺旋相连。当Ca^{2+}结合到CaM上时，其构象会发生改变，由“闭合”的状态转变为“开放”的状态，即2个螺旋之间的夹角增大，同时蛋白表面的性质也由亲水转为疏水[6]。这种构象变化使得CaM能够更有效地通过疏水作用力和静电相互作用与靶蛋白结合并调控其功能。虽然CaM本身没有催化活性，但一旦与Ca^{2+}结合形成复合物，能够通过调控多种下游靶蛋白，例如转录因子、转运蛋白、蛋白激酶、蛋白磷酸酶等，从而调节细胞的各种生理活动[5, 7]。

拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）中有7个CaM编码基因，分为*CaM1/4*、*CaM2/3/5*、*CaM6/7*三个亚类。此外，拟南芥中还有50个CML编码基因[8]。其他植物中也有多个CaM和CML的编码基因。例如，水稻（*Oryza sativa*）含有5个CaM基因和32个CML基因[9]；大豆（*Glycine max*）有6个CaM基因和144个CML基因；番茄（*Solanum lycopersicum*）含有6个CaM基因和52个CML基因[10]。与CaM类似，CML通常含有1–6个EF手型结构域[11]，通过结合Ca^{2+}而行使Ca^{2+}信号感受器的功能[12-13]。CML与Ca^{2+}结合后，结构发生改变，暴露出一个疏水性区域，这增强了其与靶蛋白的结合能力[14]。目前已有部分CML的生理功能得到了鉴定。拟南芥CML42可参与植物对食草动物的防御过程，并调控毛状体细胞的形态[12]。CML37、CML38和CML39与生物

和非生物胁迫响应相关[15]。CML9在植物免疫中发挥功能[16-17]。烟草CML蛋白rgsCaM能够与病毒蛋白HCPro的RNA结合结构域互作，通过抑制HCPro的活性从而促进植物对病毒的防卫[18]。CML24通过结合自噬相关蛋白ATG4b正向调节细胞的自体吞噬过程[17]。CML18通过与液泡Na^+/H^+反向转运体NHX1互作而参与耐盐调节[19]。CML20可负向调控保卫细胞ABA信号通路[20]。过量表达水稻CML基因*OsMSR2*可提高植物对ABA的敏感性，并增强对盐胁迫和干旱胁迫的抗性[21]。过量表达*ShCML44*有助于提高番茄对多种非生物胁迫的抗性[22]。过表达小麦*TaCML20*则有助于促进小麦中可溶性糖的积累并能够提高籽粒产量[23]。CML38通过与靶蛋白PEPR2互作并通过油菜素内酯信号调控植物在低氮胁迫下根系的发育[24]。水稻CML16可与PILS7a协同调节冷胁迫下幼苗主根伸长[25]。木瓜CML15通过与PP2C46/65相互作用调控果实成熟[26]。

转录调控是植物应答生物与非生物胁迫过程中信号转导的重要环节，其精准的启动与关闭决定了细胞命运与抗胁迫能力[27]。目前，许多转录因子已经被鉴定为CaM/CML结合蛋白（CaM/CML-binding protein, CBP），包括CAMTA（Calmodulin-binding transcription activator；也称为Signal Response, SR）、CBP60（calmodulin-binding protein 60 kDa）、WRKY、MYB、NAC（NAM, ATAF1/2, CUC2 domain-containing protein）、bZIP（basic leucine zipper domain-containing protein）和MADS-box等基因家族成员。大量研究表明，CaM/CML介导的转录调控在植物应对干旱、盐碱、低温、高温等非生物胁迫中发挥着重要作用。本文综述了CaM/CML介导的转录调控在植物响应各种非生物胁迫中的功能与作用机制，深入解析这一机制不仅有助于揭示植物体内Ca^{2+}信号调控网络，并为提高作物抗逆性以及应对全球气候变化提供潜在的改良策略。

1　Ca^{2+}/CaM介导的转录调控

1.1　Ca^{2+}结合转录因子

拟南芥NIG1（NaCl-inducible gene 1）是目前植物中唯一具有Ca^{2+}结合能力的转录因子。该蛋白定位于细胞核，由511个氨基酸残基组成，其N端含有一段EF手型结构域，C端则含有一个bHLH结构域。NIG1与Ca^{2+}的结合能力较CaM弱。研究表明，NIG1通过与下游基因启动子区域的E-box（CANNTG）结合，行使转录激活的功能[28]。

1.2　CaM7可作为转录调节因子

拟南芥AtCaM7是一类具有非常规转录调节功能的CaM亚型，可以直接结合DNA并调控下游基因的转录，这区别于经典的CaM仅作为Ca^{2+}信号感受器的作用模式。AtCaM7能够结合到核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基*RBCS-1A*（Ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1A）及叶绿素A/B结合蛋白编码基因*CAB1*（*chlorophyll a/b binding protein 1*）启动子中的Z-box（ATACGTGT），从而激活这些基因的表达[29]。此外，AtCaM7还可以直接结合*HY5*（elongated hypocotyl 5）启动子中的E-box（CAATTG）和T/G box（CACGTT），在植物不同的发育阶段调节*HY5*的表达[30]。有研究表明，将AtCaM7的EF手型结构域中4个天冬氨酸替换成丙氨酸，则无法与*HY5*的启动子结合，说明这4个天冬氨酸在其与DNA结合过程中发挥关键作用[29]。结构与点突变研究表明，AtCaM7通过其第127位精氨酸与DNA主链鸟嘌呤形成特异性的氢键和静电相互作用，从而实现与特异性DNA序列的结合[31]。COP1（constitutively photomorphogenic 1）是一种76 kD的RING类E3泛素连接酶，是光形态建成中的一个关键抑制因子。在拟南芥*cop1*突变体中过量表达*AtCaM7*可以显著促进植物的光形态建成，同时上调*RBCS-1A*、*CAB1*和*CHS1*基因的表达，增加了花青素和叶绿素的积累，说明AtCaM7通过直接结合靶基因启动子发挥转录调节功能，且与COP1协同调控下游基因[32]。然而，目前其他植物中是否存在与AtCaM7类似功能的CaM尚不清楚，具有DNA结合功能的CaM是否只存在于个别物种仍需进一步明确。

1.3　CBP60

CBP60蛋白家族最早在玉米中被发现。拟南芥[33]、水稻[34]、大豆[35]和茄子[36]中分别含有7、19、19和10个CBP60家族成员基因。拟南芥中5个CBP60蛋白已被证实能够与CaM结合。通常AtCBP60与CaM结合的位点位于蛋白的C端[33, 37]，但AtCBP60g的CaM结合区域位于N端一段45个氨基酸序列内[38]。值得注意的是，AtCBP60g的同源

蛋白SARD1（systemic acquired resistance deficient 1）不能与CaM结合[37]。烟草中AtSARD1的同源蛋白NtSARD1的N端却能够以Ca^{2+}依赖的方式与CaM结合[39]，表明同一家族的不同成员以及不同物种中的同源蛋白与CaM结合的亲和力存在差异。

1.4 CAMTA

CAMTA广泛存在于多细胞真核生物中。*NtER1*是在植物中发现的首个CAMTA基因[40]。研究表明，CAMTA基因家族的原始祖先序列可能起源于绿藻[41]，在植物中已鉴定到多个CAMTA家族的基因，其中拟南芥、水稻、番茄和大豆中分别有6、7、7和15个[42-46]。

CAMTA家族蛋白包含多个保守结构域，从N端到C端依次是CG-1 DNA结合结构域、TIG结构域、锚蛋白重复序列（ANK）、IQ基序（IQXXXRGXXXR）和Ca^{2+}依赖的CaM结合结构域（CaM-binding domain, CaMBD）。其中，IQ基序与CaM/CML的结合不依赖Ca^{2+}，而CaMBD与CaM的结合依赖Ca^{2+}。CAMTA家族蛋白通过其CG-1结构域识别并结合下游靶基因启动子区域的CG-box基序［(A/C/G)CGCG(G/T/C)或(A/C)CGTGT］[40, 42]。将AtCAMTA3的CG-1结构域中6个保守氨基酸残基突变后再转入拟南芥*camta3*突变体中，无法回补该突变体生长受抑的表型，表明CG-1结构域在AtCAMTA3的功能中发挥关键作用[40]。CAMTA家族蛋白的转录激活结构域（TAD）位于CG-1结构域的下游[47-48]。CAMTA通过其CaMBD可以Ca^{2+}依赖的方式结合CaM[49]，也可通过IQ基序以Ca^{2+}非依赖的方式与CaM/CML相互作用。例如，拟南芥CAMTA1、CAMTA2和CAMTA3可通过IQ基序与CML13和CML14相互作用[14]。但这些CAMTA与不同CaM或CML家族成员结合的偏好性仍有待研究。

1.5 WRKYIId

WRKY转录因子家族成员均含有一段保守的氨基酸序列WRKYGQK以及C2H2（Cys_2His_2-type）或C2HC（Cys_2HisCys-type）类型的锌指样（zinc finger-like）基序，这2部分共同组成了一个长约60个氨基酸的功能区，称为WRKY结构域[50]。这些转录因子主要通过WRKY结构域识别并结合下游基因启动子中的W-box（TTGACC/T），从而调控基因的表达。根据结构的不同，WRKY转录因子可分为3类：第一类含有2个WRKY结构域；第二类仅含有1个WRKY结构域，并具有典型的锌指结构；第三类同样仅有1个WRKY结构域，但其锌指结构有所不同[50]。

目前已鉴定到一组WRKY转录因子为CBP。拟南芥WRKYIId亚组成员WRKY7[51]及该亚组其他成员（WRKY11、WRKY15、WRKY17、WRKY21、WRKY39和WRKY74），均具有CaMBD[51]。其他植物的WRKYIId组成员，如长花百合中的WRKY39[52]、虎杖中的WRKY11[53]和茶树中的WRKY7[54]也含有CaMBD，并能以Ca^{2+}依赖的方式与CaM互作。WRKYIId转录因子还可以与CML相互作用。最近的研究表明，拟南芥CML49和CML50可以感知病原菌诱导的核内钙信号，通过其EF手型结构域结合Ca^{2+}后，可以借助内在无序区（IDR）组装为分子凝聚体，然后特异性捕获WRKY11/17负调控因子，从而通过解除WRKY11/17对免疫相关基因的转录抑制来促进植物抗病[55]。其他WRKYIId成员是否与CML互作仍有待研究。

除了WRKYIId组成员外，一些其他类型的WRKY转录因子也被鉴定为CBP。如拟南芥WRKYIII组的成员WRKY53能够与CaM1相互作用，但在高Ca^{2+}条件下，CaM1-WRKY53复合物则会解离[56-57]。但CaM如何调控WRKY53的功能仍需要进一步研究。

1.6 其他与CaM结合的转录因子

MYB家族转录因子的特征是含有MYB结构域，即一个高度保守的MYB DNA结合结构域，通常由4个不完美重复序列单元构成，每个单元长度约为52个氨基酸，可折叠形成3个α-螺旋结构[58]。目前已发现多个MYB家族转录因子可与CaM/CML结合。例如，以受盐胁迫诱导表达的大豆GmCaM4为探针，研究人员从盐胁迫处理的拟南芥cDNA表达文库中鉴定到一个CaM结合的转录因子MYB2，其包含一个Ca^{2+}依赖的CaMBD，且GmCaM1和GmCaM4可不同地调节MYB2的DNA结合活性[59]。此外，小麦（*Triticum aestivum*）TaMYB44也可以与TaCaM2相互作用，而且后者还受到上游微小RNA Tae-miR1118的转录后调控[60]。

NAC转录因子由一个N端保守的NAC结构域和一个高度可变的C端结构域组成。CBNAC是一个被鉴定为CaM结合型的NAC转录因子[61]。CBNAC可通过与下游基因启动子区域的CBNAC结合位点结合，从而抑制下游基因的表达。有趣的是，CBNAC与CaM结合后其抑制活性显著增强[61]。

TGA（TGACG-binding factor）转录因子属于碱性亮氨酸拉链（bZIP）家族，具有3个主要结构域：保守的bZIP结构域、高度可变的N端区域和C端的DOG1（delay of germination 1）结构域[62]。重组蛋白体外结合实验和体内互作验证实验表明Ca^{2+}/CaM复合物在体内和体外均可与AtTGA3互作，并增强其与靶基因启动子区TGACG顺式作用元件的结合[63-64]。此外，利用CaM作为探针的蛋白质微阵列研究表明，TGA4、TGA6和TGA9等多个TGA蛋白可能也是CBP[65]，但这些成员与CaM的互作关系及调控机制仍需进一步研究。

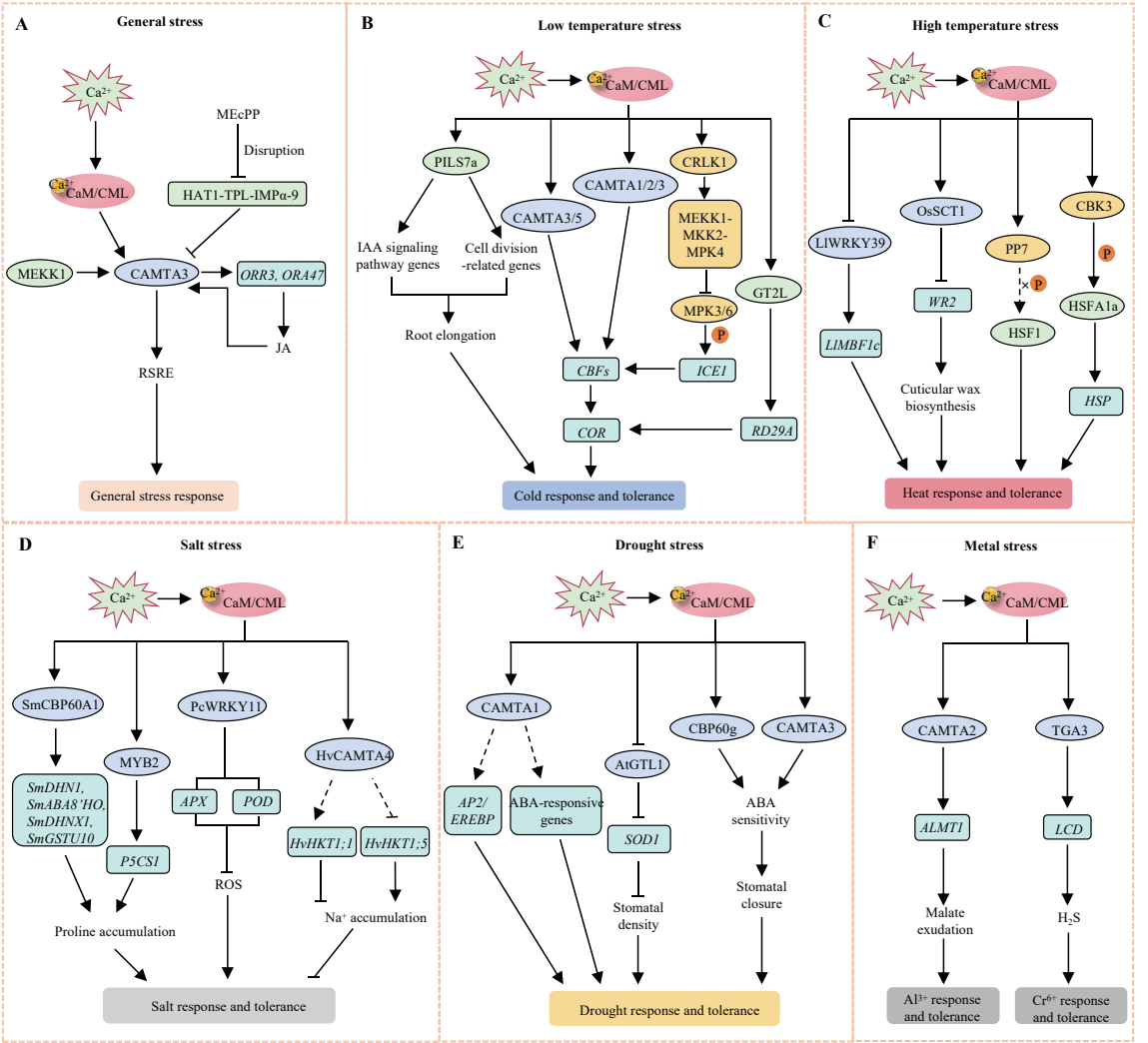
2　CaM/CML介导的转录调控在通用胁迫反应中的作用

通用胁迫反应（general stress response, GSR）又称核心逆境响应，是一类在不同物种间广泛存在、进化上高度保守的基础应答机制。植物GSR不同于低温、干旱、盐害等特异胁迫应答，不具备胁迫类型特异性，在各类环境胁迫下可被快速激活并产生瞬时和广谱的转录重编程，使植物预先做好准备，以应对后续特异性胁迫应答[66]。通过对快速伤口反应（rapid wound response）中诱导基因的启动子进行分析，研究人员发现了一种高度富集的顺式元件，将其命名为快速应激反应元件（rapid stress response element, RSRE；CGCGTT）[67]。该元件是一种GSR相关的功能性顺式作用元件，其核苷酸序列与CG-box基序显著相似[66-67]。研究表明，使用2种Ca^{2+}爆发诱导剂鞭毛蛋白22（flg22）和低聚半乳糖醛酸均可显著激活RSRE，而使用Ca^{2+}螯合剂乙二醇四乙酸（EGTA）则会显著抑制RSRE驱动LUC的表达（RSRE::LUC）[68]。与Ca^{2+}信号在RSRE激活中的作用一致，通过烟草叶片的瞬时表达分析以及*camta3*突变体的分析结果显示，CAMTA3能够激活与RSRE融合的报告基因的表达[68]。拟南芥*mekk1*突变体中伤口诱导的RSRE激活水平升高，并且其激活峰值较野生型提前约60 min。对拟南芥*mekk1 camta3*双突变体的分析表明，CAMTA3在GSR调控中位于MEKK1的下游[69]。然而，MEKK1介导的MAPK信号通路是否以及如何参与CAMTA3调控的GSR，还有待进一步研究。

甲基赤藓糖醇环二磷酸（methylerythritol cyclodiphosphate, MEcPP）是质体甲基赤藓糖醇磷酸（methylerythritol phosphate, MEP）途径的代谢中间产物，是一种新型的逆向信号分子，可以调节植物的胁迫响应[70]。研究表明，在拟南芥*ceh1*（*constitutive expression of hydroperoxide lyase 1*）中，MEcPP的过度积累引发了广泛的转录组变化，尤其是启动子含有RSRE的基因[70]。最近的研究阐明了MEcPP激活CAMTA3的分子机制。在正常生长条件下，CAMTA3被HAT1/TPL/IMPα-9抑制复合体所结合，无法正常行使功能；而在胁迫条件下，MEcPP的积累会破坏该抑制复合物，从而释放CAMTA3并启动GSR。此外，CAMTA3还参与茉莉酸（jasmonic acid, JA）诱导的GSR。茉莉酸甲酯（MeJA）可增强*CAMTA3*的表达水平，并诱导RSRE::LUC报告基因的活性；同时，CAMTA3可通过促进*OPR3*（12-oxophytodienoate reductase 3）和*ORA47*（*octadecanoid-responsive AP2/ERF-domain protein 47*）的表达来正向调控JA的生物合成[70]（图1-A）。

3　CaM/CML介导的转录调控在低温胁迫反应中的作用

CBF/DREB（dehydration-responsive element binding protein/C-repeat binding factor）转录因子可直接激活冷响应基因（cold-responsive genes）的表达，在低温胁迫反应中发挥核心作用[71]。拟南芥CAMTA1、CAMTA2和CAMTA3可直接结合*CBF2*启动子中的CG-box基序并诱导其表达，从而增强植物的抗冻能力[43, 72]（图1-B）。此外，拟南芥CAMTA3和CAMTA5也可诱导*CBF1*和*CBF2*的表达，调节植物对快速降温的响应[73]。此外，冷胁迫也可诱导大豆和茄子等作物中*CAMTA*基因的表达[74]。茄子SmCAMTA2能与乙烯响应因子SmERF1相互作用，并正向调控*SmCBF2*的表达[74]。水稻中CAMTA转录因子CTB3可通过激活海藻糖-6-磷酸磷酸酶*TPP1*的表达，降低海藻糖-6-磷酸（T6P）含量水平，促



Ca^{2+}:钙离子,CaM:钙调蛋白,CML:类钙调蛋白,P:磷酸化修饰,RSRE:快速应激响应元件,CBF:C-重复结合因子,HSP:热休克蛋白,ABA:脱落酸,ROS:活性氧,H_2S:硫化氢。A:通用胁迫反应;B:低温胁迫反应;C:高温胁迫反应;D:盐胁迫反应;E:干旱胁迫反应;F:金属离子胁迫反应

Ca^{2+}: calcium ion; CaM: calmodulin; CML: calmodulin-like protein; P: phosphorylation modification; RSRE: rapid stress response element; CBF: C-repeat binding factor; HSP: heat shock protein; ABA: abscisic acid; ROS: reactive oxygen species; H_2S: hydrogen sulfide. A: General stress response; B: cold stress response; C: heat stress response; D: salt stress response; E: drought stress response; F: metal ion stress response

图1 CaM/CML介导的转录调控在各种非生物胁迫反应中的作用机制

Fig. 1 Schematic diagram of CaM/CML-mediated transcriptional regulation in plant responses to various abiotic stresses

进穗部糖分积累，从而增强水稻的耐冷性[47]。

拟南芥GT2L是GT-2亚家族的成员之一，可通过C端DNA结合结构域中的CaMBD与CaM发生特异性结合。过量表达*GT2L*可显著提高冷诱导基因*RD29A*和盐诱导基因*ERD10*的表达[75]，表明GT2L可能在植物对低温和盐胁迫的响应中发挥正向作用。AtCaM4可与PATL1转录因子结合，并以不依赖CBF的方式负向调节植物的耐寒性[76]。拟南芥受体样激酶CRLK1的活性也受到Ca^{2+}/CaM的调控[77]。在低温胁迫下，*crlk1*突变体中*CBF1*、*RD29A*、*COR15a*和*KIN1*等冷响应基因的诱导出现延迟，表明CRLK1在植物耐寒中发挥正向作用。此外，CRLK1在冷胁迫抗性中充当Ca^{2+}/CaM信号与MAPK信号之间的桥梁；其可以通过激活MEKK1-MKK2-MPK4模块，抑制MPK3和MPK6的活性，从而降低MPK3和MPK6对ICE1（inducer of CBF expression 1）的磷酸化，维

持ICE1的稳定性和转录活性，最终通过正向调控*CBF*的表达增强植物的抗冷性[78]。在番茄中，CaM6能与ICE1相互作用并抑制其转录活性，进而抑制下游冷响应基因（如*CBF1*、*BBX17*、*PR1*）的表达水平，负向调控植物的耐冷性[79]。在低温胁迫下，水稻OsCML16能以Ca^{2+}依赖的方式与PIN-LIKES7a（PILS7a）的细胞质环区发生特异性结合，进而通过增强吲哚乙酸（indole-3-acetic acid, IAA）信号通路相关基因（如*OsIAA11*、*OsIAA23*和*OsARF16*）以及细胞分裂标记基因（如*OsRAN1*、*OsRAN2*和*OsLTG1*）的转录水平，促进水稻幼苗主根的伸长生长[25]（图1-B）。

4　CaM/CML介导的转录调控在高温胁迫反应中的作用

拟南芥*cam3*突变体耐热性下降，而*CaM3*过表达植株的耐热性则增强[80]。CaM3位于一氧化氮（NO）信号下游，参与调节热休克因子HSF（heat shock factor）的激活、热休克蛋白HSP（heat shock protein）的积累以及植物对热胁迫的耐受性[81]。在拟南芥中异源过表达*OsCaM1-1*可增强热胁迫抗性，并且这种抗性与非诱导温度下热击反应基因表达相关[82]。

拟南芥丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶PP7以Ca^{2+}依赖的方式与CaM相互作用[83]，而PP7又能与HSF1相互作用，表明Ca^{2+}/CaM-PP7可能通过影响HSF1的活性来调节热胁迫耐性[84]。此外，CBK3（Calmodulin-binding protein kinase 3）能以Ca^{2+}/CaM依赖的方式磷酸化HSFA1a，进而通过调控下游*HSP*基因的表达来调节热胁迫反应[85]（图1-C）。百合LlCaM3以Ca^{2+}依赖的方式与LlWRKY39相互作用，阻碍LlWRKY39对*LlMBF1c*（multiprotein bridging factor 1c）表达的促进，从而抑制耐热性[52]。此外，水稻CAMTA蛋白SCT1（sensing Ca^{2+} transcription factor 1）可通过下调蜡质合成调节因子*WR2*（*wax biosynthesis regulatory 2*）的表达，抑制蜡质积累，从而负向调控耐热性[86]。水稻*TT2*（*THERMOTOLERANCE 2*）基因的功能缺失型自然变异能够减弱低温胁迫下细胞内Ca^{2+}浓度的升高幅度，进而降低Ca^{2+}依赖的CaM-SCT1蛋白互作，从而削弱热胁迫诱导的*OsWR2*下调，使耐热性增强[86]（图1-C）。然而，其他物种中CAMTA等CaM/CML结合型转录因子是否以及如何调控植物耐热性仍有待研究。

5　CaM/CML介导的转录调控在盐胁迫反应中的作用

在盐胁迫下CaM/CML主要通过CAMTA、CBP60、MYB、WRKY等转录因子家族调控盐响应基因的表达。RNA-seq和ChIP-PCR分析发现，CAMTA3可能参与调控多个盐响应基因的表达，包括*ATKTI1*、*MDAR3*、*HSP90-7*、*GST1*、*GLP9*以及*MYB2*[87]（图1-D）。盐胁迫可通过NADPH氧化酶介导ROS的产生增强*CAMTA3 m*RNA的稳定性；该过程依赖其3′编码区中约500个核苷酸的特异性序列，且不依赖NMD（nonsense-mediated mRNA decay）、外切核糖核酸酶XRN4（exoribonuclease 4）或mRNA去帽途径，揭示了植物盐胁迫响应中一种全新的mRNA稳定性调控机制[88]。拟南芥*camta6*突变体在种子萌发阶段对盐胁迫的耐受性增强，而*camta6 hkt1*双突变体在盐胁迫条件下表现出更高的敏感性，表明*HKT1;1*（high-affinity K^+ transporter 1;1）在*camta6*的耐盐性中发挥关键作用[89]。与Ca^{2+}信号在植物耐盐性中的作用一致，在生长培养基中额外添加Ca^{2+}可显著促进拟南芥在盐胁迫下的种子萌发[89]。拟南芥CAMTA6可与CML13相互作用，而*cml13*突变体也表现出与*camta6*突变体相似的耐盐表型，且在*camta6*和*cml13*单突变体中，可能受到CAMTA6调控的盐胁迫响应基因*AtHKT1;1*、*AtWRKY25*和*AtWRKY28*等呈现出相似的表达趋势[14]，表明CML13-CAMTA6复合物可能参与盐胁迫响应的调控[14]。大麦（*Hordeum vulgare* L.）HvCaM1可能通过与HvCAMTA4结合，进而使下游基因*HvHKT1;5*表达量下调、*HvHKT1;1*表达量上调，从而减少盐胁迫条件下植株地上部分Na^+的积累[90]（图1-D）。在盐胁迫条件下，与*HvCaM1*过表达株系和野生型植株相比，*HvCaM1*基因敲除植株表现出生物量显著增加的特征，同时其地上部分的Na^+浓度、木质部的Na^+装载量以及Na^+的运输速率均显著降低[90]。但HvCAMTA4与HvCaM1的结合以及HvCAMTA4对下游候选基因*HvHKT1;5*和*HvHKT1;1*的调控还需要进一步实验证实。

其他与CaM结合的转录因子，如CBP60、

WRKY和MYB家族成员，在植物响应盐胁迫的过程中也发挥重要作用。例如，过表达大豆*GmCBP60A-1*基因可显著增强拟南芥和大豆对盐胁迫的耐受力[35]。通过病毒诱导基因沉默技术沉默茄子*SmCBP60A1*基因的表达，植株对盐胁迫的敏感性显著增加，这一现象与多个盐胁迫相关基因，如脱水素1（*Solanum melongena dehydrin 1*，*SmDHN1*）、*SmABA8′HO*（*abscisic acid 8′-hydroxylase*）、*SmDHNX1*（dehydrin X 1）、和*SmGSTU10*（*glutathione S-transferase tau 10*）的表达水平下调有关，并与脯氨酸含量和过氧化氢酶活性的降低密切相关[36]（图1-D）。过表达*PcWRKY11*可上调氧化应激相关基因如抗坏血酸过氧化物酶*APX*（ascorbate peroxidase）和过氧化物酶*POD*（peroxidase）的表达，增强植株活性氧清除的能力，从而提高其对盐胁迫的耐受性[91]。此外，过表达大豆*GmCaM4*基因可通过激活CaM结合转录因子MYB2，促进Δ1-吡咯啉-5-羧酸合成酶*P5CS1*（*delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase 1*）的表达，从而增强脯氨酸生物合成能力及盐胁迫耐受性[59]（图1-D）。

6 CaM/CML介导的转录调控在干旱胁迫反应中的作用

CaM/CML主要通过调控CAMTA、GTL1、CBP60等转录因子家族的活性，介导干旱胁迫下的基因转录重编程，进而调控ABA信号通路与逆境应答基因表达，在植物的抗旱性中发挥关键的调控作用。拟南芥*camta1*突变体对渗透胁迫高度敏感；转录组分析结果表明，CAMTA1可能通过调控AP2/EREBP转录因子及ABA响应基因的表达，参与植物对干旱胁迫的反应[92]（图1-E）。但CAMTA1调控的下游靶基因仍有待鉴定，此外，CAMTA1是否通过与其他类型转录因子相互作用共同调控下游基因仍有待明确。拟南芥CAMTA3除了抑制水杨酸（salicylic acid, SA）的生物合成及其信号通路[49]，在ABA反应及干旱胁迫耐性方面也发挥重要作用。*camta3*突变体表现出干旱敏感和ABA不敏感的表型。通过敲除SA合成酶基因*ICS1*或SA激活因子基因*PAD4*，或过表达SA降解酶*NahG*来降低*camta3*突变体的SA水平，*camta3*干旱敏感和ABA不敏感的表型可恢复[93]（图1-E）。过表达大豆*GmCAMTA12*可显著增强转基因拟南芥及毛状根转化大豆在干旱胁迫下的生长[94]，而在拟南芥中过表达*GmCAMTA2*和*GmCAMTA8*会导致植株对干旱胁迫的耐受性下降[95]。番茄CAMTA基因*SlSR1L*可被干旱胁迫诱导表达，而沉默*SlSR1L*会显著降低番茄对干旱胁迫的耐受能力，表明SlSR1L在干旱胁迫反应中具有正向调控作用[44]。最近的研究表明，番茄SlSR3L通过负向调控蛋白酶抑制因子*SlPI26*的表达，使SlPI26无法抑制天冬氨酸蛋白酶SlPhyt2的活性，从而在干旱诱导的花脱落过程中发挥正向调控作用[96]。SlCaM2和SlCaM6能够与SlSR3L相互结合，从而增强其对*SlPI26*等靶基因的转录抑制能力。与野生型植株相比，*Slcam2 Slcam6*双突变体在干旱胁迫下的落花率显著降低[96]。黄薇（*Heimia myrtifolia*）、藜麦（*Chenopodium quinoa*）、普通小麦（*Triticum aestivum* L.）和毛果杨（*Populus trichocarpa*）等多种植物中，某些*CAMTA*家族基因均可被干旱胁迫诱导表达[97-99]。然而，这些基因在植物干旱胁迫反应中的具体功能仍需进一步明确。

拟南芥GTL1（GT-2 LIKE 1）是一个能够与CaM结合的GTL家族转录因子，在干旱胁迫反应中发挥负调控作用。Ca^{2+}/CaM可与GTL1 N端的三螺旋DNA结合结构域中的第2个螺旋发生相互作用，破坏GTL1 N端的疏水核心结构，并通过别构效应抑制第3个螺旋与气孔发育负调控因子*SDD1*（stomatal density and distribution 1）启动子的结合[100]（图1-E）。功能缺失突变体*gtl1*在干旱胁迫下会表现出更高的存活率，这主要归因于突变体叶片下表皮气孔密度降低，以及*SDD1*表达水平上调，以减少蒸腾作用[101]。此外，来源于欧洲山杨（*Populus tremula*）与银白杨（*P. alba*）杂交种的PtaGTL1也具有与CaM结合的能力。研究表明，在*atgtl1-4*突变体中由*AtGTL1*启动子驱动*PtaGTL1*过表达可抑制*atgtl1-4*突变体耐旱和高水分利用效率的表型[102]。

拟南芥*CBP60g*过表达可显著提高植株对ABA的敏感性，并增强其对干旱胁迫的适应能力[103]。AtWRKY11和AtWRKY17是拟南芥WRKY IId亚家族的重要成员，在植物响应盐胁迫、ABA信号以及甘露醇诱导的渗透胁迫过程中发挥作用。*atwrky11*和*atwrky17*基因敲除突变体在盐胁迫、ABA以及甘露

醇处理的条件下，种子萌发率和根系生长均受到显著的抑制[104]，但其具体作用机制仍有待阐明。

7　CaM/CML介导的转录调控在金属胁迫反应中的作用

蓝莓（*Vaccinium corymbosum*）VcCaM1可通过调节Ca^{2+}稳态及抗氧化系统，调控植株对铝（Al）毒害的耐受性[105]。拟南芥CML24与CAMTA2相互作用，促使CAMTA2结合*ALMT1*（aluminum-activated malate transporter）启动子中的CG-box并调控该基因的表达，使根系苹果酸分泌量增加，从而提升植株对铝胁迫的耐受性[106]。拟南芥CML24-CAMTA2复合体还可以与WRKY46相互作用，解除WRKY46对*ALMT1*基因表达的抑制作用，从而提高*ALMT1*的表达水平，增强植株对铝毒害的抗性[107]（图1-F）。此外，拟南芥在六价铬离子（Cr^{6+}）胁迫下，Ca^{2+}/CaM2能与TGA3相互作用，二者结合后能增强下游L-半胱氨酸硫解酶基因（LCD, L-cysteine desulfhydrase）的表达，进而通过促进内源硫化氢（H_2S）的产生，增强拟南芥对Cr^{6+}胁迫的抗性[64]（图1-F）。CaM/CML介导的转录调控在其他重金属胁迫（如镉毒害）中的作用仍有待研究。

8　展望

在自然生态环境中，植物通常同时或相继面临干旱、盐碱、高温、低温等多种非生物和生物胁迫。当前的研究多聚焦于单一胁迫的响应机制。植物如何通过Ca^{2+}-CaM/CML信号来应对多重胁迫，仍然是一个亟待深入探究的问题。一些CaM/CML及其调控的转录因子，如OsCaM1-1、AtCAMTA3、AtWRKY53等，能在多种生物与非生物胁迫反应中发挥重要作用，可能充当信号通路交汇点的作用。进一步挖掘具有多重逆境反应调控作用的CaM/CML及其相关转录因子，有助于发现具有多重逆境抗性的遗传改良靶点。如何调控这些基因的表达模式或蛋白的活性，以促进作物对多重逆境，尤其是生物和非生物组合胁迫的抗性，值得深入研究。

许多CaM/CML基因或蛋白在非生物胁迫下会被诱导表达，但其下游CBP的鉴定及其功能的解析仍然十分有限。虽然在模式植物拟南芥中取得了一些关于CaM/CML介导的逆境反应的进展，但CaM/CML及其下游的转录因子在作物中的研究仍然较少。对于CAMTA和CBP60等经典的CaM/CML结合型转录因子家族，但它们介导的精细的调控网络仍不够清楚。CAMTA转录因子中IQ基序与CaMBD与CaM/CML家族成员结合的偏好性如何，它们在结合中对Ca^{2+}不同依赖性的调控机制仍不够清楚。CaM/CML结合型转录因子与众多CaM/CML家族成员结合是否具有特异性，这是否与特定环境信号有关，又是如何与环境胁迫诱导的Ca^{2+}信号的解码相联系，仍需要进一步阐明。此外，植物体内CaM/CML及其下游转录因子的液–液相分离在非生物胁迫反应中的作用机制尚不清楚。

未来可借助多组学整合分析策略，系统性地解析CaM/CML结合型转录因子在植物应对多重环境胁迫中的调控网络。例如，通过结合转录组测序、ChIP-seq和DAP-seq可以鉴定CAMTA转录因子在盐等胁迫下的靶基因，再结合单细胞RNA-seq可以解析细胞特异性调控模块。通过自然等位变异分析、分子育种、基因或启动子编辑等策略，靶向CaM/CML下游的转录因子，有助于挖掘可用于作物抗逆遗传改良的新靶点。利用CRISPR/Cas9基因编辑技术可通过改变CaM/CML结合型转录因子中与CaM/CML结合的氨基酸序列（如CaMBD或IQ基序），促进或抑制其与CaM/CML的结合而改良其抗逆的功能。借助基因编辑技术，可精准编辑目标基因启动子区的顺式作用元件以改变其逆境应答模式或组织表达模式，或改变其蛋白翻译后修饰的位点和功能结构域，提高其逆境下的表达量和活性，从而有望提高作物抗逆性以及培育出可更好适应全球气候变化的“气候智能型”作物。

参考文献

[1] Zhang HM, Zhu JH, Gong ZZ, et al. Abiotic stress responses in plants [J]. Nat Rev Genet, 2022, 23(2): 104-119.

[2] Leisner CP, Potnis N, Sanz-Saez A. Crosstalk and trade-offs: Plant responses to climate change-associated abiotic and biotic stresses [J]. Plant Cell Environ, 2023, 46(10): 2946-2963.

[3] Luan S, Wang C. Calcium signaling mechanisms across Kingdoms [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2021, 37: 311-340.

[4] Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, et al. Calcium at the crossroads of signaling [J]. Plant Cell, 2002, 14(suppl 1): S401-S417.

[5] Zeng HQ, Zhu QQ, Yuan PG, et al. Calmodulin and calmodulin-

like protein-mediated plant responses to biotic stresses [J]. Plant Cell Environ, 2023, 46(12): 3680-3703.

[6] La Verde V, Dominici P, Astegno A. Towards understanding plant calcium signaling through calmodulin-like proteins: a biochemical and structural perspective [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(5): 1331.

[7] Kim MC, Chung WS, Yun DJ, et al. Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants [J]. Mol Plant, 2009, 2(1): 13-21.

[8] Zhu XY, Dunand C, Snedden W, et al. CaM and CML emergence in the green lineage [J]. Trends Plant Sci, 2015, 20(8): 483-489.

[9] Bongkoj B, Teerapong B. Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins [J]. BMC Plant Biol, 2007, 7(1): 4.

[10] Munir S, Khan MRG, Song JW, et al. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of calmodulin-like (CML) proteins in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. Plant Physiol Biochem, 2016, 102: 167-179.

[11] Gifford JL, Walsh MP, Vogel HJ. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca^{2+}-binding helix-loop-helix EF-hand motifs [J]. Biochem J, 2007, 405(2): 199-221.

[12] Dobney S, Chiasson D, Lam P, et al. The calmodulin-related calcium sensor CML42 plays a role in trichome branching [J]. J Biol Chem, 2009, 284(46): 31647-31657.

[13] 曾后清, 张亚仙, 汪尚, 等. 植物钙/钙调素介导的信号转导系统 [J]. 植物学报, 2016, 51(5): 705-723.
Zeng HQ, Zhang YX, Wang S, et al. Calcium/calmodulin-mediated signal transduction system in plants [J]. Chin Bull Bot, 2016, 51 (5): 705-723.

[14] Hau B, Symonds K, Teresinski H, et al. *Arabidopsis* calmodulin-like proteins CML13 and CML14 interact with calmodulin-binding transcriptional activators and function in salinity stress response [J]. Plant Cell Physiol, 2024, 65(2): 282-300.

[15] Scholz SS, Vadassery J, Heyer M, et al. Mutation of the *Arabidopsis* calmodulin-like protein CML37 deregulates the jasmonate pathway and enhances susceptibility to herbivory [J]. Mol Plant, 2014, 7 (12): 1712-1726.

[16] Leba LJ, Cheval C, Ortiz-Martín I, et al. CML9, an *Arabidopsis* calmodulin-like protein, contributes to plant innate immunity through a flagellin-dependent signalling pathway [J]. Plant J, 2012, 71(6): 976-989.

[17] Tsai YC, Koo Y, Delk NA, et al. Calmodulin-related CML24 interacts with ATG4b and affects autophagy progression in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2013, 73(2): 325-335.

[18] Nakahara KS, Masuta C, Yamada S, et al. Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(25): 10113-10118.

[19] Yamaguchi T, Aharon GS, Sottosanto JB, et al. Vacuolar Na^+/H^+ antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca^{2+}- and pH-dependent manner [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(44): 16107-16112.

[20] Wu XM, Qiao Z, Liu HP, et al. CML20, an *Arabidopsis* Calmodulin-like protein, negatively regulates guard cell ABA signaling and drought stress tolerance [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 824.

[21] Xu GY, Rocha PSCF, Wang ML, et al. A novel rice calmodulin-like gene, *OsMSR2*, enhances drought and salt tolerance and increases ABA sensitivity in *Arabidopsis* [J]. Planta, 2011, 234(1): 47-59.

[22] Munir S, Liu H, Xing YL, et al. Overexpression of calmodulin-like (ShCML44) stress-responsive gene from *Solanum habrochaites* enhances tolerance to multiple abiotic stresses [J]. Sci Rep, 2016, 6: 31772.

[23] Kalaipandian S, Xue GP, Rae AL, et al. Overexpression of *TaCML20*, a calmodulin-like gene, enhances water soluble carbohydrate accumulation and yield in wheat [J]. Physiol Plant, 2019, 165(4): 790-799.

[24] Song XY, Li JF, Lyu ML, et al. CALMODULIN-LIKE-38 and PEP1 RECEPTOR 2 integrate nitrate and brassinosteroid signals to regulate root growth [J]. Plant Physiol, 2021, 187(3): 1779-1794.

[25] Liu S, Zheng YY, Zhao LY, et al. CALMODULIN-LIKE16 and PIN-LIKES7a cooperatively regulate rice seedling primary root elongation under chilling [J]. Plant Physiol, 2024, 195(2): 1660-1680.

[26] Zhu QN, Tan QQ, Gao QY, et al. Calmodulin-like protein CML15 interacts with PP2C46/65 to regulate *Papaya* fruit ripening via integrating calcium, ABA and ethylene signals [J]. Plant Biotechnol J, 2024, 22(6): 1703-1723.

[27] 胡雅丹, 伍国强, 刘晨, 等. MYB转录因子在调控植物响应逆境胁迫中的作用 [J]. 生物技术通报, 2024, 40(6): 5-22.
Hu YD, Wu GQ, Liu C, et al. Roles of MYB transcription factor in regulating the responses of plants to stress [J]. Biotechnol Bull, 2024, 40(6): 5-22.

[28] Kim J, Kim HY. Functional analysis of a calcium-binding transcription factor involved in plant salt stress signaling [J]. FEBS Lett, 2006, 580(22): 5251-5256.

[29] Kushwaha R, Singh A, Chattopadhyay S. Calmodulin7 plays an important role as transcriptional regulator in *Arabidopsis* seedling development [J]. Plant Cell, 2008, 20(7): 1747-1759.

[30] Abbas N, Maurya JP, Senapati D, et al. *Arabidopsis* CAM7 and HY5 physically interact and directly bind to the *HY5* promoter to regulate its expression and thereby promote photomorphogenesis [J]. Plant Cell, 2014, 26(3): 1036-1052.

[31] Kumar S, Mazumder M, Gupta N, et al. Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* calmodulin7 and insight into its mode of DNA

binding [J]. FEBS Lett, 2016, 590(17): 3029-3039.

[32] Senapati D, Kushwaha R, Dutta S, et al. COP1 regulates the stability of CAM7 to promote photomorphogenic growth [J]. Plant Direct, 2019, 3(6): e00144.

[33] Truman W, Sreekanta S, Lu Y, et al. The CALMODULIN-BINDING PROTEIN60 family includes both negative and positive regulators of plant immunity [J]. Plant Physiol, 2013, 163(4): 1741-1751.

[34] Wang YM, Shen CB, Jiang QC, et al. Seed priming with calcium chloride enhances stress tolerance in rice seedlings [J]. Plant Sci, 2022, 323: 111381.

[35] Yu Q, Liu YL, Sun GZ, et al. Genome-wide analysis of the soybean calmodulin-binding protein 60 family and identification of GmCBP60A-1 responses to drought and salt stresses [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(24): 13501.

[36] Shen L, He J, Yang X. Genome-wide identification of calmodulin-binding protein 60 gene family and function of SmCBP60A1 in eggplant response to salt stress [J]. Sci Hortic, 2023, 322: 112448.

[37] Zhang YX, Xu SH, Ding PT, et al. Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(42): 18220-18225.

[38] Wang L, Tsuda K, Sato M, et al. *Arabidopsis* CaM binding protein CBP60g contributes to MAMP-induced SA accumulation and is involved in disease resistance against *Pseudomonas syringae* [J]. PLoS Pathog, 2009, 5(2): e1000301.

[39] Takagi K, Tasaki K, Komori H, et al. Hypersensitivity-related genes *HSR201* and *HSR203J* are regulated by calmodulin-binding protein 60-type transcription factors and required for pathogen signal-induced salicylic acid synthesis [J]. Plant Cell Physiol, 2022, 63(7): 1008-1022.

[40] Yang TB, Poovaiah BW. A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants [J]. J Biol Chem, 2002, 277(47): 45049-45058.

[41] Xiao PX, Feng JW, Zhu XT, et al. Evolution analyses of CAMTA transcription factor in plants and its enhancing effect on cold-tolerance [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 758187.

[42] Choi MS, Kim MC, Yoo JH, et al. Isolation of a calmodulin-binding transcription factor from rice (*Oryza sativa* L.) [J]. J Biol Chem, 2005, 280(49): 40820-40831.

[43] Kim Y, Park S, Gilmour SJ, et al. Roles of CAMTA transcription factors and salicylic acid in configuring the low-temperature transcriptome and freezing tolerance of *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2013, 75(3): 364-376.

[44] Li XH, Huang L, Zhang YF, et al. Tomato SR/CAMTA transcription factors SlSR1 and SlSR3L negatively regulate disease resistance response and SlSR1L positively modulates drought stress tolerance [J]. BMC Plant Biol, 2014, 14: 286.

[45] Pant P, Iqbal Z, Pandey BK, et al. Genome-wide comparative and evolutionary analysis of Calmodulin-binding Transcription Activator (CAMTA) family in *Gossypium* species [J]. Sci Rep, 2018, 8: 5573.

[46] Wang GP, Zeng HQ, Hu XY, et al. Identification and expression analyses of calmodulin-binding transcription activator genes in soybean [J]. Plant Soil, 2015, 386(1/2): 205-221.

[47] Li J, Guo HF, Lou QJ, et al. Natural variation of indels in the CTB3 promoter confers cold tolerance in *Japonica* rice [J]. Nat Commun, 2025, 16: 1613.

[48] Chao LM, Kim Y, Gilmour SJ, et al. Temperature modulation of CAMTA3 gene induction activity is mediated through the DNA binding domain [J]. Plant J, 2022, 112(1): 235-248.

[49] Du LQ, Ali GS, Simons KA, et al. Ca^{2+}/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity [J]. Nature, 2009, 457 (7233): 1154-1158.

[50] Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, et al. WRKY transcription factors [J]. Trends Plant Sci, 2010, 15(5): 247-258.

[51] Park CY, Lee JH, Yoo JH, et al. WRKY group IId transcription factors interact with calmodulin [J]. FEBS Lett, 2005, 579(6): 1545-1550.

[52] Ding LP, Wu Z, Teng RD, et al. LlWRKY39 is involved in thermotolerance by activating LlMBF1c and interacting with LlCaM3 in lily (*Lilium longiflorum*) [J]. Hortic Res, 2021, 8: 36.

[53] Wang GW, Wang XW, Ma HP, et al. PcWRKY11, an II-d WRKY transcription factor from *Polygonum cuspidatum*, enhances salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(8): 4357.

[54] Chen W, Hao WJ, Xu YX, et al. Isolation and characterization of CsWRKY7, a subgroup IId WRKY transcription factor from *Camellia sinensis*, linked to development in *Arabidopsis* [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(11): 2815.

[55] Mo WP, Liu Z, Zhang XY, et al. Calmodulin-like protein condensates decode PAMP-induced nuclear calcium to activate plant immunity [J]. Cell Rep, 2026, 45(4): 117092.

[56] Sun YD, Yu DQ. Activated expression of AtWRKY53 negatively regulates drought tolerance by mediating stomatal movement [J]. Plant Cell Rep, 2015, 34(8): 1295-1306.

[57] Jiao CY, Li KX, Zuo YX, et al. CALMODULIN1 and WRKY53 function in plant defense by negatively regulating the jasmonic acid biosynthesis pathway in *Arabidopsis* [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(14): 7718.

[58] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, et al. MYB transcription factors in *Arabidopsis* [J]. Trends Plant Sci, 2010, 15(10): 573-581.

[59] Yoo JH, Park CY, Kim JC, et al. Direct interaction of a divergent CaM isoform and the transcription factor, MYB2, enhances salt tolerance in *Arabidopsis* [J]. J Biol Chem, 2005, 280(5): 3697-3706.

[60] Zhang YY, Ma CY, Li XQ, et al. Wheat tae-MIR1118 constitutes a functional module with calmodulin TaCaM2-1 and MYB member TaMYB44 to modulate plant low-N stress response [J]. Plant Cell Environ, 2025, 48(3): 2178-2199.

[61] Kim HS, Park BO, Yoo JH, et al. Identification of a calmodulin-binding NAC protein as a transcriptional repressor in *Arabidopsis* [J]. J Biol Chem, 2007, 282(50): 36292-36302.

[62] Duan Y, Xu ZS, Liu H, et al. Genome-wide identification of the TGA gene family and expression analysis under drought stress in *Brassica napus* L. [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(12): 6355.

[63] Szymanski DB, Liao BR, Zielinski RE. Calmodulin isoforms differentially enhance the binding of cauliflower nuclear proteins and recombinant TGA3 to a region derived from the *Arabidopsis* Cam-3 promoter [J]. Plant Cell, 1996, 8(6): 1069.

[64] Fang HH, Liu ZQ, Long YP, et al. The Ca^{2+}/calmodulin2-binding transcription factor TGA3 elevates *LCD* expression and H_2S production to bolster Cr^{6+} tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2017, 91(6): 1038-1050.

[65] Popescu SC, Popescu GV, Bachan S, et al. Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density *Arabidopsis* protein microarrays [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(11): 4730-4735.

[66] Bjornson M, Dandekar A, Dehesh K. Determinants of timing and amplitude in the plant general stress response [J]. J Integr Plant Biol, 2016, 58(2): 119-126.

[67] Walley JW, Coughlan S, Hudson ME, et al. Mechanical stress induces biotic and abiotic stress responses via a novel *cis*-element [J]. PLoS Genet, 2007, 3(10): e172.

[68] Benn G, Wang CQ, Hicks DR, et al. A key general stress response motif is regulated non-uniformly by CAMTA transcription factors [J]. Plant J, 2014, 80(1): 82-92.

[69] Bjornson M, Benn G, Song XS, et al. Distinct roles for mitogen-activated protein kinase signaling and CALMODULIN-BINDING TRANSCRIPTIONAL ACTIVATOR3 in regulating the peak time and amplitude of the plant general stress response [J]. Plant Physiol, 2014, 166(2): 988-996.

[70] Benn G, Bjornson M, Ke HY, et al. Plastidial metabolite MEcPP induces a transcriptionally centered stress-response hub via the transcription factor CAMTA3 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(31): 8855-8860.

[71] 张晓燕, 杨淑华, 丁杨林. 植物感知和传递低温信号的分子机制 [J]. 生物技术通报, 2023, 39(11): 28-35.
Zhang XY, Yang SH, Ding YL. Molecular mechanism of cold signal perception and transduction in plants [J]. Biotechnol Bull, 2023, 39(11): 28-35.

[72] Doherty CJ, Van Buskirk HA, Myers SJ, et al. Roles for *Arabidopsis* CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance [J]. Plant Cell, 2009, 21(3): 972-984.

[73] Kidokoro S, Yoneda K, Takasaki H, et al. Different cold-signaling pathways function in the responses to rapid and gradual decreases in temperature [J]. Plant Cell, 2017, 29(4): 760-774.

[74] Cai P, Lan YH, Gong FY, et al. Identification and molecular characterization of the CAMTA gene family in Solanaceae with a focus on the expression analysis of eggplant genes under cold stress [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(4): 2064.

[75] Xi J, Qiu YJ, Du LQ, et al. Plant-specific trihelix transcription factor AtGT2L interacts with calcium/calmodulin and responds to cold and salt stresses [J]. Plant Sci, 2012, 185: 274-280.

[76] Chu MX, Li JJ, Zhang JY, et al. AtCaM4 interacts with a Sec14-like protein, PATL1, to regulate freezing tolerance in *Arabidopsis* in a CBF-independent manner [J]. J Exp Bot, 2018, 69(21): 5241-5253.

[77] Yang TB, Chaudhuri S, Yang LH, et al. A calcium/calmodulin-regulated member of the receptor-like kinase family confers cold tolerance in plants [J]. J Biol Chem, 2010, 285(10): 7119-7126.

[78] Li H, Ding YL, Shi YT, et al. MPK3- and MPK6-mediated ICE1 phosphorylation negatively regulates ICE1 stability and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. Dev Cell, 2017, 43(5): 630-642.e4.

[79] Lin R, Song JN, Tang MJ, et al. CALMODULIN6 negatively regulates cold tolerance by attenuating ICE1-dependent stress responses in tomato [J]. Plant Physiol, 2023, 193(3): 2105-2121.

[80] Zhang W, Zhou RG, Gao YJ, et al. Molecular and genetic evidence for the key role of AtCaM3 in heat-shock signal transduction in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2009, 149(4): 1773-1784.

[81] Xuan Y, Zhou S, Wang L, et al. Nitric oxide functions as a signal and acts upstream of AtCaM3 in thermotolerance in *Arabidopsis* seedlings [J]. Plant Physiol, 2010, 153(4): 1895-1906.

[82] Wu HC, Luo DL, Vignols F, et al. Heat shock-induced biphasic Ca^{2+} signature and OsCaM1-1 nuclear localization mediate downstream signalling in acquisition of thermotolerance in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Cell Environ, 2012, 35(9): 1543-1557.

[83] Kutuzov MA, Bennett N, Andreeva AV. Interaction of plant protein *Ser*/thr phosphatase PP7 with calmodulin [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289(2): 634-640.

[84] Liu HT, Li GL, Chang H, et al. Calmodulin-binding protein phosphatase PP7 is involved in thermotolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Environ, 2007, 30(2): 156-164.

[85] Liu HT, Gao F, Li GL, et al. The calmodulin-binding protein kinase 3 is part of heat-shock signal transduction in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 2008, 55(5): 760-773.

[86] 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.

[87] Prasad KVSK, Abdel-Hameed AAE, Jiang QY, et al. DNA-binding activity of CAMTA3 is essential for its function: identification of critical amino acids for its transcriptional activity [J]. Cells, 2023, 12(15): 1986.

[88] Abdel-Hameed AAE, Prasad KVSK, Jiang QY, et al. Salt-induced stability of SR1/CAMTA3 mRNA is mediated by reactive oxygen species and requires the 3′ end of its open reading frame [J]. Plant Cell Physiol, 2020, 61(4): 748-760.

[89] Shkolnik D, Finkler A, Pasmanik-Chor M, et al. Calmodulin-binding transcription activator 6: a key regulator of Na^+ homeostasis during germination [J]. Plant Physiol, 2019, 180(2): 1101-1118.

[90] Shen QF, Fu LB, Su TT, et al. Calmodulin HvCaM1 negatively regulates salt tolerance via modulation of HvHKT1s and HvCAMTA4 [J]. Plant Physiol, 2020, 183(4): 1650-1662.

[91] Wang DZ, Wu X, Gao SQ, et al. Systematic analysis and identification of drought-responsive genes of the CAMTA gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23 (9): 4542.

[92] Pandey N, Ranjan A, Pant P, et al. CAMTA 1 regulates drought responses in *Arabidopsis thaliana* [J]. BMC Genom, 2013, 14: 216.

[93] Zeng HQ, Wu HC, Wang GP, et al. *Arabidopsis* CAMTA3/SR1 is involved in drought stress tolerance and ABA signaling [J]. Plant Sci, 2022, 319: 111250.

[94] Noman M, Jameel A, Qiang WD, et al. Overexpression of GmCAMTA12 enhanced drought tolerance in *Arabidopsis* and soybean [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(19): 4849.

[95] Baek D, Cho HM, Cha YJ, et al. Soybean calmodulin-binding transcription activators, GmCAMTA2 and GmCAMTA8, coordinate the circadian regulation of developmental processes and drought stress responses [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(14): 11477.

[96] Wang S, Ge SQ, Liu XF, et al. A regulatory network involving calmodulin controls phytosulfokine peptide processing during drought-induced flower abscission [J]. Plant Cell, 2024, 37(1): koaf013.

[97] Wei M, Xu XM, Li CH. Identification and expression of CAMTA genes in *Populus trichocarpa* under biotic and abiotic stress [J]. Sci Rep, 2017, 7: 17910.

[98] Yang LY, Zhao Y, Zhang GZ, et al. Identification of CAMTA gene family in *Heimia myrtifolia* and expression analysis under drought stress [J]. Plants, 2022, 11(22): 3031.

[99] Zhu XL, Wang BQ, Wei XH, et al. Characterization of the *CqCAMTA* gene family reveals the role of CqCAMTA03 in drought tolerance [J]. BMC Plant Biol, 2022, 22: 428.

[100] Yoo CY, Mano N, Finkler A, et al. A Ca^{2+}/CaM-regulated transcriptional switch modulates stomatal development in response to water deficit [J]. Sci Rep, 2019, 9: 12282.

[101] Yoo CY, Pence HE, Jin JB, et al. The *Arabidopsis* GTL1 transcription factor regulates water use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density via transrepression of *SDD1* [J]. Plant Cell, 2011, 22(12): 4128-4141.

[102] Weng H, Yoo CY, Gosney MJ, et al. Poplar GTL1 is a Ca^{2+}/calmodulin-binding transcription factor that functions in plant water use efficiency and drought tolerance [J]. PLoS One, 2012, 7 (3): e32925.

[103] Wan DL, Li RL, Zou B, et al. Calmodulin-binding protein CBP60g is a positive regulator of both disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Rep, 2012, 31(7): 1269-1281.

[104] Ali MA, Azeem F, Nawaz MA, et al. Transcription factors WRKY11 and WRKY17 are involved in abiotic stress responses in *Arabidopsis* [J]. J Plant Physiol, 2018, 226: 12-21.

[105] Inostroza-Blancheteau C, Aquea F, Loyola R, et al. Molecular characterisation of a calmodulin gene, *VcCaM1*, that is differentially expressed under aluminium stress in highbush blueberry [J]. Plant Biol J, 2013, 15(6): 1013-1018.

[106] Tokizawa M, Kobayashi Y, Saito T, et al. Sensitive to proton rhizotoxicity1, calmodulin binding transcription activator2, and other transcription factors are involved in *ALUMINUM-activated malate TRANSPORTER1* expression [J]. Plant Physiol, 2015, 167 (3): 991-1003.

[107] Zhu X, Wang P, Bai ZM, et al. Calmodulin-like protein CML24 interacts with CAMTA2 and WRKY46 to regulate *ALMT1*-dependent Al resistance in *Arabidopsis thaliana* [J]. New Phytol, 2022, 233(6): 2471-2487.

（责任编辑　张婷婷）

生物技术通报
·综述与专论· BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):24-34

球孢白僵菌促进植物生长的作用机制及应用进展

叶霄 孙佩* 童文* 许文志 黄雯 陶珊 龙燕梅
（四川省农业科学院经济作物研究所，成都 610300）

摘 要： 球孢白僵菌（*Beauveria bassiana*）长期以来被视为重要的昆虫病原真菌，广泛应用于农业和林业害虫的生物防治。近年研究表明，该菌能以兼性内生方式定殖于植物组织内部，在不引起明显病害症状的同时促进植物生长并增强其对病虫害的抵抗力，展现出“控虫-促生”一体化应用的独特潜力。本文系统综述了国内外关于球孢白僵菌促进植物生长的研究进展，重点从内生定殖特征、促生表现、作用机制（激素调控、诱导抗性、促进营养吸收、根际微生态调节）及应用潜力与面临的挑战等方面进行了深入总结。现有证据表明，该菌通过多维度的生理与生态互作提升作物产量与抗逆性，但在田间应用的稳定性验证、复合制剂的研发以及生态安全性评估等方面仍存在亟待解决的瓶颈。未来研究应致力于解析分子互作机制、构建高效工程菌株，并探索其与植物育种的协同路径，以期为球孢白僵菌作为多功能微生物资源的规模化农业应用提供理论支撑。

关键词： 球孢白僵菌；内生定殖；促生长；根际微生态；应用进展
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0152

Mechanisms and Application Advances of *Beauveria bassiana* in Promoting Plant Growth

YE Xiao SUN Pei* TONG Wen* XU Wen-zhi HUANG Wen TAO Shan LONG Yan-mei
(*Industrial Crop Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu* 610300)

Abstract: *Beauveria bassiana* has long been regarded as an important entomopathogenic fungus and has been widely applied in the biological control of agricultural and forestry pests. Recent studies have shown that this fungus can colonize internal plant tissues as a facultative endophyte, promoting plant growth and enhancing plant resistance to pests and diseases without causing obvious disease symptoms. These features highlight its unique potential for integrated “pest control-plant growth promotion” applications. This review systematically summarizes recent advances in research on the plant growth-promoting effects of *B. bassiana* in China and abroad, with particular emphasis on its endophytic colonization characteristics, growth-promoting performance, underlying mechanisms, including hormonal regulation, induced resistance, enhanced nutrient acquisition, and rhizosphere microbiome modulation, as well as its application potential and associated challenges. Current evidence indicates that *B. bassiana* can improve crop productivity and stress resistance through multidimensional physiological and ecological interactions. However, several key bottlenecks remain to be addressed, including the validation of field application and stability, the development of compound formulations, and comprehensive ecological safety assessment. Future research should focus on elucidating the molecular mechanisms underlying plant-fungus interactions, constructing efficient engineered strains, and exploring synergistic strategies that integrate *B. bassiana* application with plant breeding. Such efforts will provide a theoretical basis for the large-scale agricultural application of *B. bassiana* as a multifunctional microbial resource.

Keywords: *Beauveria bassiana*; endophytic colonization; growth promotion; rhizosphere microecology; application advances

球孢白僵菌（*Beauveria bassiana*）隶属于子囊菌门（Ascomycota）肉座菌目（Hypocreales），是土壤、植物根际和多类农田生态系统中常见的昆虫病原真菌。长期以来，该菌被广泛开发为微生物杀虫剂，

收稿日期：2026-01-30
基金项目：国家中药材产业技术体系（CARS-21），四川省财政自主创新项目（2022ZZCX078）
*通信作者：孙佩 sunpei210@163.com，童文 tongwen222@163.com

用于防控多种农业与林业害虫，其产业化生产与制剂体系已相对成熟[1-5]。球孢白僵菌典型的杀虫过程为：分生孢子黏附于昆虫表皮后萌发，形成侵染结构并分泌多种角质层降解相关酶类实现穿透入侵，并在虫体内增殖、产生毒素，最终导致寄主死亡[6]。然而，近年来研究者逐渐认识到球孢白僵菌并非仅具杀虫作用，它还能在不引起明显病害症状的情况下与植物建立互作关系，并在一定条件下促进植物生长或增强抗逆性[7-8]。这一发现拓展了球孢白僵菌作为微生物菌肥的潜力，已成为植物保护与农业微生物领域的新兴研究热点[9]。

在全球粮食安全与生态健康压力日益凸显的背景下，减少化学农药和化肥的过量投入已不仅是生产方式的选择，更是农业绿色转型的现实需求[10-11]。联合国环境规划署等机构的评估指出，农药与化肥的长期不当使用会带来环境与健康风险，并加剧生态系统负担；大量研究也强调土壤-作物系统中污染物累积与残留问题对生态安全与人类健康的潜在影响[12-14]。因此，兼具控虫与促生双重潜力的球孢白僵菌，被视为可持续农业中具有独特应用前景的微生物资源[15-16]。

从已有报道来看，球孢白僵菌对植物的促生作用并非由单一机制造成，而是植物、真菌和外界环境共同作用的综合结果。相关研究对象已从玉米、小麦、棉花等大田作物，扩展到番茄、葡萄等园艺作物以及部分药用或功能植物，但不同体系中观察到的表型并不完全一致。基于此，本文围绕球孢白僵菌在植物上的内生定殖与促生表现，进一步梳理其可能涉及的调节机制，并结合现有产品和田间研究讨论其应用潜力与主要限制，以期为后续菌株筛选、机理研究和生产应用提供参考。

1　球孢白僵菌在植物中的内生定殖与促生作用

1.1　在植物上的内生定殖

球孢白僵菌具备兼性内生能力，可在植物内部组织无明显病症地存活与扩展，其内生定殖被认为是促生与诱导抗性等效应发生的必要前提。人工导入可采用多种接种方式，但定殖往往呈现局部化且阶段性特征。显微研究表明，在叶面喷施条件下，孢子萌发后穿透角质层，菌丝可沿叶片胞间隙向栅栏薄壁组织和叶肉组织中延伸，少量情况下进入木质部，具备在植株内部迁移的潜力[17-18]。此外，气孔与伤口被认为是常见的真菌进入通道，但不同植物-菌株体系下叶部侵入效率差异显著[7]。

内生定殖效率受菌株数量、寄主类型、接种方式与环境因素的影响，表现出明显的植物组织偏好与时间动态。例如，在咖啡幼苗中，球孢白僵菌通过叶喷、土壤灌根与茎注射均可实现内生定殖，但叶喷定殖率最低，且随接种时间推移检出率整体呈下降趋势[19]；在木薯体系中，土壤浇灌可使白僵菌在根部形成内生定殖，但在处理植株的茎与叶中未检出，提示根-根际区域可能更利于白僵菌的内生定殖[20]。

1.2　在植物上的促生表现

在农业生产和园艺实践中，球孢白僵菌通常通过种子浸泡或包衣、根部处理、土壤灌根以及叶面喷施等方式与植物接触并建立内生互作。其促生表现主要集中在苗期生长势增强、根系发育优化、生物量积累、产量或品质性状改善以及逆境适应能力等方面（表1）。例如在水稻中，球孢白僵菌可显著提升出苗率、苗高、根长、幼苗活力指数以及鲜重和干重[21]，表现为典型的苗期生长势增强；在蚕豆中，种子浸泡不仅提高出苗率与主根长度、株高、叶片数及地上部和根鲜重，且浸种时间越长促生效果越明显[22]；在棉花中，种子包衣可提高出苗率与生长势并增强叶绿素含量[23]；在油菜中则表现为株高与叶绿素含量的提升[24]；对于观赏植物向日葵与小花锦葵，主要体现在促进萌发、生长与逆境适应性的改善[25-26]。

在产量或经济性状方面，接种球孢白僵菌使小麦麦穗干重显著提升[27]；在玉米体系中，升高的CO_2浓度下植株株高与叶面积上升，并带来总生物量与百粒重的增加[28]；在番茄中，结果数与单株产量均有明显增长[16]；而在功能性植物北葱中，白僵菌处理后叶片总生物碱含量显著提高[29]。

总体而言，球孢白僵菌在模式植物和部分主要作物中的促生证据相对更充分，而在药用植物、园艺植物以及特色经济作物上的研究仍显不足，尤其缺少从定殖动态到表型形成再到分子机制的连续证据链。在拟南芥、小麦、番茄和玉米等体系中，已有研究借助转录组、代谢组或激素谱分析发现，白僵菌内生定殖可引起宿主防御通路、次级代谢、生

表1 球孢白僵菌在植物上的促生表现

Table 1 Growth-promoting effects of *Beauveria bassiana* on plants

植物种类 Plant species	处理方式 Treatment method	促生效果 Growth-promoting effects	关键机制 Key mechanisms	参考文献 References
拟南芥 *Arabidopsis thaliana*	根部浸染	叶片数量增加、花序缩短,根系生物量增加	植物防御通路转录重编程;与植物抗毒素、JA和SA信号通路相关的基因表达改变	[30]
普通小麦与硬粒小麦 *Triticum aestivum* and *Triticum durum*	土壤灌根;种子包衣;叶面喷施	普通小麦:种子包衣增加开花期总根长,灌根与包衣显著增加穗干重与总粒重;硬粒小麦:土壤灌根增加穗干重	部分矿质元素水平改变;激素信号(脱落酸/水杨酸/茉莉酸)改变	[27]
玉米 *Zea mays*	根部浸染	CO_2升高环境下,株高、叶面积显著提高,总生物量增加14.5%,百粒重增加显著	吲哚-3-乙酸等促生激素含量提高,过氧化物酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和苯丙氨酸解氨酶活性均显著上升	[28]
水稻 *Oryza sativa*	种子浸泡;叶面喷施	显著提高出苗率、苗高与根长,提升幼苗活力指数及鲜/干重	–	[21]
番茄 *Solanum lycopersicum*	土壤灌根;种子浸泡	主根长和株高增加;结果数增加,单株产量提高	抗病基因(氧化酶、几丁质酶等)上调;过强免疫反应受抑;能量代谢与生长相关激素上调	[16]
大豆 *Glycine max*	种子浸种;根部灌根;叶面喷施	浸种和灌根显著促进株高、叶面积和鲜重;叶面喷施显著增加叶面积和鲜重	–	[31]
蚕豆 *Vicia faba*	种子浸泡	出苗率、主根长、株高、叶对数及地上部/根鲜重显著提高;浸种时间越长促生越明显	–	[22]
棉花 *Gossypium hirsutum*	种子包衣	出苗率和生长势(叶片数、株高、茎粗等)显著提高;地上部鲜重/干重增加;叶绿素含量提高	–	[23]
观赏向日葵 *Helianthus annuus*	种子浸泡;根部灌根	种子萌发率提高33%–50%	–	[25]
北葱 *Allium schoenoprasum*	幼苗浸泡	叶片总生物碱含量提高约52%–92%	–	[29]
油菜 *Brassica napus*	种子浸泡;根部灌根	显著提高植株高度和叶绿素含量	–	[24]
小花锦葵 *Malva parviflora*	种子浸泡	干旱胁迫下,农艺性状(株高/根长等)改善;叶片含水量、蛋白质和碳水化合物含量更高	–	[26]

注:“–”为无相关研究

Note: “–” indicates that no related studies are available

长–防御权衡以及激素信号网络的重编程，并与苗期生长、生物量或产量性状变化密切相关[16, 27-28, 30]。

2 球孢白僵菌促进植物生长的作用机制

球孢白僵菌促进植物生长是多机制综合作用的结果，既包括直接的生理影响，也涉及间接的生态互作。结合目前已有研究，其促生机制主要可归纳为以下4个方面（图1）。

2.1 产生与调控生长激素

植物生长激素是协调植物生长发育与环境响应的一类内源小分子信号物质[32-33]。其中，吲哚-3-乙酸（indole-3-acetic acid, IAA）驱动细胞伸长与器官形成[34]；吲哚-3-丁酸（indole-3-butyric acid, IBA）可转化为IAA，参与根系构型的塑造[35]；赤霉素（gibberellin, GA）则主要通过解除抑制决定株高与生物量积累[36]；水杨酸（salicylic acid, SA）与

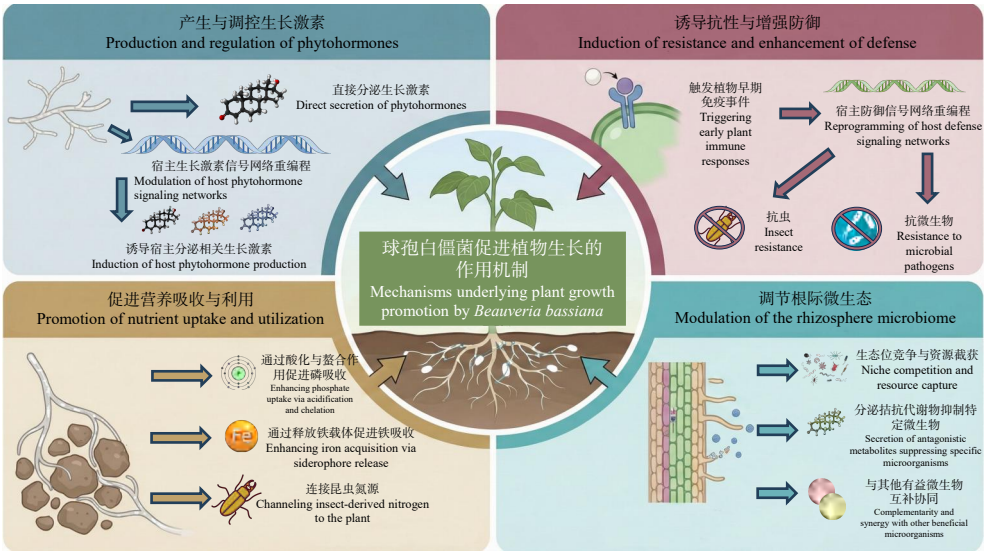


图1　球孢白僵菌促进植物生长的作用机制

Fig. 1　Mechanisms of *Beauveria bassiana* promoting plant growth

茉莉酮酸（jasmonate, JA）则在调控防御的同时也深度参与根系生长与发育过程[37-38]。

球孢白僵菌进入植物体后，主要通过两条并行路径影响激素网络：一方面，真菌自身可产生或转化激素样代谢物；另一方面，它诱导宿主植物对内源激素通路进行重配。在昆虫表皮培养条件下，部分白僵菌菌株被证实能分泌IAA，推测其合成途径包括色胺途径（Trp→TAM→IAAld→IAA）和吲哚-3-乙酰胺途径（Trp→IAM→IAA）[39]。在植物端，这种互作同样引发了可检测的激素变化。玉米体系的代谢组学分析显示，白僵菌处理不仅诱导了SA、JA等防御相关激素的升高，还促进了IAA、IBA等生长素代谢物的积累，致使“植物激素信号转导”（plant hormone signal transduction）通路在代谢组层面显著富集[28]；番茄体系中亦观察到叶片激素网络的重配，显示GA前体（如GA9、GA20）、活性赤霉素以及JA等成分显著提高[40]。

2.2　诱导抗性与增强防御

球孢白僵菌的内生定殖能够以较低的代谢代价提升植物的抗逆性（包括抗病和抗虫）。白僵菌刺激植物开启一种“激发状态”（priming），使得植物在尚未遭遇真实生物胁迫时并不长期维持高强度的防御投入，而一旦受到取食或侵染，则能更快、更强地启动防御反应，从而在维持正常生长的同时获得有效保护[7, 41-42]。

在抗虫方面，番茄–烟粉虱体系研究表明，白僵菌可促进番茄特异性抗虫活性成分（如α-solanine等）的积累，并影响相关合成基因的表达，从而抑制粉虱繁殖[43-44]；此外，内生定殖还能上调植物防御相关基因（如*PIN2*、*PR2*、*PAL*、*MPK3*）的表达，并伴随茉莉酸介导的防御代谢增强[45]。在抗病方面，玉米体系中土壤接种白僵菌可降低由土耳其突脐孢菌引起的大斑病发生率，这一过程伴随着内生细菌群落结构的显著改变，尤其是潜在有益细菌类群的富集[46]；在水稻中，白僵菌定殖后再接种立枯丝核菌，亦能显著降低病害发生率并改善部分生长指标[21]。

从分子识别过程看，球孢白僵菌的细胞壁成分或分泌物作为微生物相关分子模式（MAMPs）被植物细胞受体感知，触发模式识别免疫（PTI）及MAPK级联反应，将信号传递至转录与代谢层面[47]。随后，JA、SA等防御激素通路发生模块化调整：JA通路主要介导抗虫与伤害响应，SA通路则参与广谱病原防御[48]。整体而言，白僵菌通过诱导植物免疫来强化宿主健康，这种间接效应是植物促生功能的重要组成部分。

2.3　促进营养吸收与利用

促进植物对养分的获取和利用是球孢白僵菌促植物生长的另一重要机制。球孢白僵菌的菌丝网络

广泛分布于根际和植物体内，拓展了植物的营养吸收界面。一方面，球孢白僵菌表现出显著的溶磷潜力，能将难溶性无机磷转化为更易被根系吸收的形态。这一过程通常与有机酸（如甲酸、乳酸、草酸及TCA循环相关酸）介导的酸化与螯合作用有关，通过降低微环境pH并络合Ca^{2+}/Fe^{3+}/Al^{3+}来释放PO_4^{3-}[49-50]。

同时，白僵菌还能产生铁载体，通过螯合环境中的Fe^{3+}并改变其化学活性，间接改善根际可利用铁水平。对番茄、小麦和高粱等作物进行的种子包衣处理表明，白僵菌能显著改善幼苗铁营养与生长表现[51]。此外，球孢白僵菌在土壤中能利用有机残体获取能量，同时又能进入植物组织建立内生共生[52]。这种生态位切换表明它可通过参与有机质分解与养分矿化，加速根际养分周转，提高贫瘠环境下的养分利用效率。同位素示踪研究更揭示了其独特的生态功能：内生昆虫病原真菌能将昆虫体内的氮源直接转移给植物利用，形成“昆虫-真菌-植物”的氮素通道，显著提升了植株的总体生产力[53]。

整体而言，球孢白僵菌通过溶磷、促铁有效转化以及连接昆虫氮源等方式，提高植物在低肥或受限环境中的养分利用效率，可作为植物的一种潜在微生物肥料。

2.4 调节根际微生态

作为土壤微生物的一员，球孢白僵菌在定殖植物后还能重塑宿主的根际和内生微生物群落，构建更为有利的植株生长微环境。在玉米体系中，接种球孢白僵菌后外源菌株可在植物根际和根表被稳定检测到，且在植物受到模拟叶部创伤时，白僵菌在根际的保留更为显著，说明植物胁迫信号可能调节其在根际的生态位占据[54]。在微生物群落层面，球孢白僵菌常表现为“选择性富集有益类群、压制病原菌”的生态效应。例如，土壤接种可降低玉米大斑病发病率，并伴随内生细菌群落结构与共现网络复杂度的上升[46]；球孢白僵菌还能作为非致病刺激源触发番茄改变根系分泌物（如促进邻茴香酸分泌），在根际形成对害虫不利的土壤环境，进而压制烟粉虱并增强植株SA/JA相关防御响应[55]。这种影响常呈有限且阶段性，在有机草莓园连续监测中，接种球孢白僵菌对土壤微生物群落的总体影响较为短暂，且受季节与地块条件制约[56]。

从作用方式看，球孢白僵菌对根际微生态的调节包括多个层面。例如在番茄与棉花的种子中接种球孢白僵菌可降低幼苗中立枯丝核菌与群结腐霉的密度[18]；球孢白僵菌分泌的挥发性有机化合物（乙醇、2-甲基丁醛和2,4-二甲基-1-庚烯等）对多类细菌具抑制活性[57]；球孢白僵菌与丛枝菌根真菌（如摩西球囊霉）的混合接种在烟草体系中可产生协同促生效应，混合接种处理组烟草的性状指标与抗氧化酶活性均优于单接种处理[58]；将球孢白僵菌与典型促生细菌（如解淀粉芽胞杆菌）联合用于种衣与根际处理，在田间同时体现促生与控虫增益[59]。

综上所述，球孢白僵菌促植物生长并非单一途径，而是通过产生与调控生长激素、诱导抗性与增强防御、促进营养吸收与利用、调节根际微生态等多个方面实现（图1）。这些作用机制相互配合，使得植物在白僵菌共生下表现出更强的生长势和环境适应力。

3 球孢白僵菌在农业应用中的潜力与挑战

球孢白僵菌兼具促生长和防病虫的双重特性，使其在农业上具有广阔的应用前景。然而，将实验室研究成果转化为田间实际生产力仍面临诸多挑战。

3.1 大田效应验证还需加强

作为微生物杀虫农药，球孢白僵菌已被纳入多类作物的绿色防控体系。例如《人民日报》报道的玉米-大豆带状间套作绿色防控实践中，球孢白僵菌被用于多种害虫的综合治理[60]；同时，农业农村部发布的园艺作物重大病虫害防控技术方案也明确提出在蓟马等害虫发生初期可喷施球孢白僵菌[61]；地方农技部门在番茄潜叶蛾等害虫防控的田间技术指导中亦将球孢白僵菌列为可选生物农药[62]。但现有球孢白僵菌促生研究仍以室内盆栽为主，在受控条件下可通过较高剂量接种、稳定温湿度与较低微生物竞争压力，提高定殖成功率与表型可重复性。而在大田环境中，紫外线辐射、低湿度与温度波动、以及土著微生物群落的强竞争，会共同影响白僵菌的存活、侵入与持续定殖，使促生效应在空间与年度尺度上更不稳定[7]。因此，需采用规范化的田间实验验证球孢白僵菌对作物促生效应的重现性与稳定性[63]。在番茄体系中，研究者同时开展盆栽与

田间试验，结果显示球孢白僵菌的定殖率在盆栽中为43.3%，田间为33.3%，说明其田间定殖可能会被环境与微生物竞争削弱，但仍能提升番茄生物量并降低灰霉病危害[16]；另一项在自然田间季节条件下开展的番茄试验表明，土施球孢白僵菌可减弱粉虱危害并改善植株表现[64]，进一步说明其在非受控环境下仍具应用潜力，但效果高度依赖施用方式与田间环境。

后续大田试验宜采用跨地点、跨季节重复设计，并尽量同步记录土壤pH、含水量、有机质、施肥制度和气象条件等协变量；同时监测白僵菌定殖动态、作物生长指标和最终产量，建立“剂量–定殖–效应”之间的响应关系。不同施用途径也应并行比较，包括种子浸种或包衣、根际灌施、拌土颗粒剂和叶面喷施等。实际推广时还需注意混配风险，例如避免与不相容的化学杀菌剂同时使用，以免削弱菌剂活性。

3.2　复合制剂开发与技术壁垒

单一菌株通常难以覆盖复杂田间环境中的全部病虫害与促生需求，复合制剂的价值在于把不同微生物的功能优势进行合理叠加，从而提高稳定性和综合效益。国内外目前已有多种单一球孢白僵菌成熟产品，如谷得丰®球孢白僵菌粉剂、绿恒丰®球孢白僵菌粉剂、绿海®球孢白僵菌可分散油悬浮剂、聚立信®球孢白僵菌可分散油悬浮剂、BotaniGard®球孢白僵菌乳化悬浮剂、Mycotrol®球孢白僵菌液体制剂等。同时，球孢白僵菌与真菌及细菌的复合制剂也不少，如聚立信®微生物菌剂成分为球孢白僵菌、苏云金芽胞杆菌和嗜酸乳杆菌，适用于多种地上与地下害虫；Katyayani®三合一微生物菌剂成分为球孢白僵菌、蜡蚧轮枝菌和绿僵菌，用于防治粉蚧、棉铃虫和毛虫等害虫；INTERACTOR®复合生物肥成分为球孢白僵菌、绿僵菌、蜡蚧轮枝菌和玫烟色拟青霉，用于促进植物生长发育；BACTIBAS®生物杀虫剂在INTERACTOR®复合生物肥的基础上增加荧光假单胞菌，用于螨虫、蓟马、潜叶蝇等的防控以及促进植物生长发育。

常用的复合微生物剂型包括以下3种：乳化悬浮剂、油分散剂与可湿性粉剂，分别具有操作便利于喷施覆盖、更利于叶面递送与环境适配、较好的贮藏稳定性等优点[65–67]。复合制剂真正的技术壁垒，在于解决相容性、活性保持与田间递送的问题。不同微生物对水分活度、pH、表面活性剂、紫外与温度的耐受差异很大，稍有不当就会出现互相抑制或贮藏期失活，因此载体与剂型选择很重要。建议基于体外相容性与助剂耐受性（如共培养拮抗、混配后萌发率和活孢子数变化等）筛选可共存组合，对表面活性剂等配方组分进行毒性与相容性验证；其次，通过合适的干燥工艺，引入外源保护剂（如油类、木质素等）提升贮藏期活性与田间耐受性；再次，在施用端结合剂型优势优化递送，喷雾制剂需规范复水与用水条件以降低吸胀损伤，必要时采用微胶囊或颗粒剂型提高紫外或高温下的持效性与残效性；最后，建立批次化质量控制与标准操作规程，以降低田间表现波动[68–69]。

3.3　宿主植物与菌株特异性问题

球孢白僵菌的植物内生定殖与促生作用具有显著的宿主基因型依赖性。以南非小麦材料为例，5个品种中的总体定殖水平在21.28%–33.54%之间波动，并受取样时间和组织部位影响，表现为根部定殖最高、叶部较低，且随接种后时间推移下降[70]。除宿主差异外，球孢白僵菌本身还呈现出突出的菌株差异。在番茄体系中，不同球孢白僵菌内生菌株可表现出不同的溶磷与产铁载体潜力，最终导致株高、生物量等指标出现显著分化[49]，而白僵菌属内不同5个种在番茄中的定殖率幅度达33.3%–56.7%[71]。同时，不同传代背景的球孢白僵菌菌株的定殖水平存在显著差异，比如小麦体系中，同一菌株分别经过昆虫宿主与植物宿主传代并再分离后，其内生定殖率差异显著[70]；将同一球孢白僵菌内生分离株在植物体内连续传代3次，发现原本在棉花上较低的叶片定殖水平（约40%–50%）在第三次传代后可提高到75%–100%[72]。

因此，内生昆虫病原真菌的应用效果具有很强的情境依赖性，可能表现为正效应，也可能无显著效应，甚至在某些组合下产生负效应[73]。比较基因组学结果提示，球孢白僵菌存在物种特异基因和功能模块差异，这为菌株生态位适应和互作能力差异提供了遗传基础[74]；监管和应用层面的共识文件也强调，微生物产品应以“菌株”为单位开展特性描述和质量控制[67]。实际研发中，建议建立

“菌株×宿主×施用方式”的定量筛选体系，在目标作物不同品种上并行比较候选菌株，并用统一指标跟踪定殖动态和终点表型，而不是将某一菌株在单一作物上的效果直接外推到其他体系。

3.4 安全性与环境影响

球孢白僵菌可合成多类活性次生代谢物，其中白僵菌素（beauvericin, BEA）是研究最充分、也最常被讨论的真菌毒素，在多种细胞模型中呈现明确的细胞毒性[75-76]，植物端是否存在BEA残留与其空间分布和产生条件高度相关[77]。需要指出的是，这类毒素主要在培养基或虫体内被检测到，经商品制剂进入食物链的量通常很低。欧盟食品安全评估认为，食用经白僵菌处理的作物时，相关白僵菌毒素摄入量低于已知会对哺乳动物产生有害影响的剂量水平[67]。

对动物和非靶标生物而言，多国监管评审普遍认为球孢白僵菌对脊椎动物、水生生物和土壤微生物等类群风险较低，但对某些非靶标节肢动物，尤其是幼虫期个体或特定功能类群，仍存在需要评估的不确定性[78]。蜜蜂接触风险研究提示，蜂群温度调控可在一定程度上降低田间施用带来的感染风险，因此在开花期施用时，宜避开蜜蜂高活动时段，减少对花器的直接喷施，并优先采用傍晚施药等管理措施[79]。对人类而言，球孢白僵菌导致临床感染的案例极为罕见，但已有急性淋巴细胞白血病患者发生播散性感染、深部组织感染以及角膜炎等病例报道[80-82]。因此，在生产、配制和施用环节仍应落实呼吸、眼部和皮肤防护，并对免疫功能低下者加强职业暴露管理。

从生态影响角度看，球孢白僵菌本来就广泛存在于自然土壤和昆虫群落中。田间施用后，它可在土壤中保留一段时间，但扩散和种群膨胀通常受宿主资源、气候条件和土壤微生物竞争限制。因而，风险评价不宜停留在“白僵菌天然存在所以一定安全”这一简单判断上，而应关注特定菌株、特定剂型和特定施用方式下的残留动态、向非目标生境漂移的可能性，以及潜在次生代谢物风险能否被持续监测和控制[83]。在监管与产业化层面，OECD（经济合作与发展组织）已发布针对球孢白僵菌菌株作为微生物植物保护产品的共识文件，强调以菌株为单位开展分类鉴定、毒理研究与质量控制等[67]。

4 总结与展望

综上所述，球孢白僵菌已不再局限于传统昆虫病原真菌的定义。它通过调控激素网络、激发系统抗性、改善养分利用及重塑根际微生态，展现了作为多功能绿色投入品的巨大价值。然而，要真正实现“一菌多效”的落地应用，未来研究与应用应聚焦于以下方向：

一是深化分子机制研究。借助基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学等多组学手段，解析白僵菌促生效应形成的关键环节。例如，可比较促生效应强弱不同菌株的基因组差异，筛选潜在功能基因[84]；通过转录组和蛋白质组了解植物在其定殖不同阶段的信号网络变化，揭示宿主重编程过程，重点关注对激素合成、养分代谢和免疫通路的交叉调控，以完善理论模型[40，43]。

二是构建高效工程菌株。合成生物学和基因编辑技术为白僵菌功能改良提供了新的工具[85-86]。已有研究显示，敲除*Bbhog1*可提高白僵菌对渗透和氧化胁迫的耐受能力[87]，过表达*Bbchit1*可提高其对蚜虫的毒性[88]。未来可围绕植物亲和性、根际竞争力、环境耐受性和促生代谢能力开展定向改造，也可引入植物内生菌常见的共生因子基因。需要注意的是，工程菌株的应用必须同步开展遗传稳定性、环境释放风险和监管合规性评价。

三是利用微生物辅助植物育种。不同植物品种对白僵菌定殖和响应差异明显，说明宿主基因型是决定共生效果的重要因素之一。未来可在作物育种或资源评价中增加对球孢白僵菌亲和性的筛选，例如关注根系分泌物组成、表皮和根际微环境特征，以及宿主免疫系统对内生真菌的容纳程度[89-90]。同时可探索植物基因工程，例如导入促进真菌共生的基因，提高作物与球孢白僵菌的协同作用。

四是开展全生态链安全评估。球孢白僵菌的长期连续施用可能影响土壤微生物多样性、害虫种群动态、天敌昆虫和非靶标节肢动物，因此需要从农田生态系统尺度开展连续监测，而不应只关注短期防效或促生指标[91]。此外，可结合气候变化背景，进一步考察白僵菌共生是否有助于缓解干旱、高CO_2、重金属等胁迫对植物的影响，为逆境农业提供

更有针对性的微生物解决方案[92]。

五是强化产品开发与应用。球孢白僵菌促生产品的落地，需要同时解决剂型、贮藏、运输、施用设备和用户操作规范等问题。在保证安全性和有效性的前提下，可探索将白僵菌促生剂纳入现有农业投入品体系，与肥料、生物农药或其他微生物制剂配套使用。尤其是在有机农业和绿色防控体系中，白僵菌制剂有望成为重要组成部分。与此同时，政策和监管也需跟进，明确促生类微生物产品的登记、质量控制和风险评价要求[67]。

总之，球孢白僵菌促植物生长研究正处在从实验探索走向应用验证的过渡阶段。它既有作为生物农药控制害虫的基础，也显示出作为微生物促生资源改善植物生长和抗逆性的潜力。但这一潜力能否真正转化为稳定的田间效益，仍取决于机制研究是否深入、菌株筛选是否精准、产品体系是否可靠以及生态安全评价是否充分。通过植物病理学、微生物学、作物栽培、分子育种和制剂工程等多学科协同，才可能更充分地挖掘球孢白僵菌的“一菌多效”价值，并为农业可持续发展和粮食安全提供更扎实的技术支撑。

参考文献

[1] Liu YM, Yang YK, Wang B. Entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* play roles of maize (*Zea mays*) growth promoter [J]. Sci Rep, 2022, 12: 15706.

[2] 况再银, 童文, 孙佩, 等. 球孢白僵菌的侵染特性及应用研究进展 [J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 3187-3197.
Kuang ZY, Tong W, Sun P, et al. Research progress in infection characteristics and application of *Beauveria bassiana* [J]. Microbiol China, 2023, 50(7): 3187-3197.

[3] Mascarin GM, Jaronski ST. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2016, 32(11): 177.

[4] 阙生全, 喻爱林, 刘亚军, 等. 白僵菌应用研究进展 [J]. 中国森林病虫, 2019, 38(2): 29-35.
Que SQ, Yu AL, Liu YJ, et al. Application research progress of *Beauveria* [J]. For Pest Dis, 2019, 38(2): 29-35.

[5] 贾雪, 隋丽, 邹晓威, 等. 真菌病毒BbOCuV1对寄主球孢白僵菌生长发育和亚洲玉米螟致病力的影响 [J]. 生物技术通报, 2025, 41(7): 312-325.
Jia X, Sui L, Zou XW, et al. Effects of the mycovirus BbOCuV1 on the growth and development of host *Beauveria bassiana* and its pathogenicity to *Ostrinia furnacalis* larvae [J]. Biotechnol Bull, 2025, 41(7): 312-325.

[6] Wang HY, Peng H, Li WJ, et al. The toxins of *Beauveria bassiana* and the strategies to improve their virulence to insects [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 705343.

[7] Vega FE. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review [J]. Mycologia, 2018, 110(1): 4-30.

[8] 刘春来. 昆虫病原真菌在农林害虫生物防治中的应用 [J]. 黑龙江农业科学, 2017(3): 68-73.
Liu CL. Application of entomopathogenic fungi in biological control of agricultural and forestry pests [J]. Heilongjiang Agric Sci, 2017 (3): 68-73.

[9] Mantzoukas S, Eliopoulos PA. Endophytic entomopathogenic fungi: a valuable biological control tool against plant pests [J]. Appl Sci, 2020, 10(1): 360.

[10] 于法稳. 新时代农业绿色发展动因、核心及对策研究 [J]. 中国农村经济, 2018(5): 19-34.
Yu FW. An analysis of the reasons, core and countermeasures of agricultural green development in the New Era [J]. Chin Rural Econ, 2018(5): 19-34.

[11] Brunelle T, Chakir R, Carpentier A, et al. Reducing chemical inputs in agriculture requires a system change [J]. Commun Earth Environ, 2024, 5: 369.

[12] Guo JH, Liu XJ, Zhang Y, et al. Significant acidification in major Chinese croplands [J]. Science, 2010, 327(5968): 1008-1010.

[13] 江润海, 姜冉冉, 朱城强, 等. 微生物强化植物修复铅污染土壤的机制研究进展 [J]. 生物技术通报, 2023, 39(8): 114-125.
Jiang RH, Jiang RR, Zhu CQ, et al. Research progress in mechanisms of microbial-enhanced phytoremediation for lead-contaminated soil [J]. Biotechnol Bull, 2023, 39(8): 114-125.

[14] Hou DY, Jia XY, Wang LW, et al. Global soil pollution by toxic metals threatens agriculture and human health [J]. Science, 2025, 388(6744): 316-321.

[15] Bamisile BS, Ali Siddiqui J, Akutse KS, et al. General limitations to endophytic entomopathogenic fungi use as plant growth promoters, pests and pathogens biocontrol agents [J]. Plants, 2021, 10(10): 2119.

[16] Sui L, Lu Y, Zhou LY, et al. Endophytic *Beauveria bassiana* promotes plant biomass growth and suppresses pathogen damage by directional recruitment [J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1227269.

[17] Wagner BL, Lewis LC. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(8): 3468-3473.

[18] Ownley BH, Griffin MR, Klingeman WE, et al. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control [J]. J Invertebr Pathol, 2008, 98(3): 267-270.

[19] Posada F, Aime MC, Peterson SW, et al. Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota:

Hypocreales) [J]. Mycol Res, 2007, 111(6): 748-757.

[20] Greenfield M, Gómez-Jiménez MI, Ortiz V, et al. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation [J]. Biol Control, 2016, 95: 40-48.

[21] Deb L, Dutta P, Tombisana Devi RK, et al. Endophytic *Beauveria bassiana* can protect the rice plant from sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani* and enhance plant growth parameters [J]. Arch Microbiol, 2022, 204(9): 587.

[22] Jaber LR, Enkerli J. Effect of seed treatment duration on growth and colonization of *Vicia faba* by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum* [J]. Biol Control, 2016, 103: 187-195.

[23] Mantzoukas S, Papantzikos V, Katsogiannou S, et al. Biostimulant and bioinsecticidal effect of coating cotton seeds with endophytic *Beauveria bassiana* in semi-field conditions [J]. Microorganisms, 2023, 11(8): 2050.

[24] 董晓慧, 杨蕙萍, 李启云, 等. 球孢白僵菌内生定殖诱导油菜抗核盘菌侵染研究 [J]. 中国油料作物学报, 2026, 48(1): 227-237.
Dong XH, Yang HP, Li QY, et al. Endophytic *Beauveria bassiana* promotes rape growth and confers resistance against *Sclerotinia* disease [J]. Chin J Oil Crop Sci, 2026, 48(1): 227-237.

[25] Wu HF, Rozlomiy NG, Zhang ZK, et al. Effects of *Beauveria bassiana* on disease biocontrol and growth of ornamental sunflower [J]. J Biobased Mat Bioenergy, 2024, 18(5): 827-833.

[26] Abdelhameed RE, Soliman ERS, Gahin H, et al. Enhancing drought tolerance in *Malva parviflora* plants through metabolic and genetic modulation using *Beauveria bassiana* inoculation [J]. BMC Plant Biol, 2024, 24: 662.

[27] Sánchez-Rodríguez AR, Raya-Díaz S, Zamarreño ÁM, et al. An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae [J]. Biol Control, 2018, 116: 90-102.

[28] Zhang YF, Wen H, Li QY, et al. From function to omics: endophytic *Beauveria bassiana* promotes maize growth by activating phytohormone signaling pathways under elevated carbon dioxide [J]. BMC Plant Biol, 2025, 25: 1759.

[29] Espinoza F, Vidal S, Rautenbach F, et al. Effects of *Beauveria bassiana* (Hypocreales) on plant growth and secondary metabolites of extracts of hydroponically cultivated chive (*Allium schoenoprasum* L. [Amaryllidaceae]) [J]. Heliyon, 2019, 5(12): e03038.

[30] Raad M, Glare TR, Brochero HL, et al. Transcriptional reprogramming of *Arabidopsis thaliana* defence pathways by the entomopathogen *Beauveria bassiana* correlates with resistance against a fungal pathogen but not against insects[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 615.

[31] 胡飞, 童友敏, 徐婷婷, 等. 球孢白僵菌Bb378不同施用方式对大豆促生及诱导抗甜菜夜蛾的增效作用 [J]. 江苏农业学报, 2025, 41(4): 656-663.
Hu F, Tong YM, Xu TT, et al. Enhancement of soybean growth and resistance to *Spodoptera exigua* by *Beauveria bassiana* Bb378 through different application methods [J]. Jiangsu J Agric Sci, 2025, 41(4): 656-663.

[32] Zhang YQ, Berman A, Shani E. Plant hormone transport and localization: signaling molecules on the move [J]. Annu Rev Plant Biol, 2023, 74: 453-479.

[33] 熊国胜, 李家洋, 王永红. 植物激素调控研究进展 [J]. 科学通报, 2009, 54(18): 2718-2733.
Xiong GS, Li JY, Wang YH. Advances in the regulatiin and crosstalks of phylohomones [J]. Chin Sci Bull, 2009, 54(18): 2718-2733.

[34] Calderón Villalobos LIA, Lee S, De Oliveira C, et al. A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin [J]. Nat Chem Biol, 2012, 8(5): 477-485.

[35] Damodaran S, Strader LC. Indole 3-butyric acid metabolism and transport in *Arabidopsis thaliana* [J]. Front Plant Sci, 2019, 10: 851.

[36] Hauvermale AL, Ariizumi T, Steber CM. Gibberellin signaling: a theme and variations on DELLA repression [J]. Plant Physiol, 2012, 160(1): 83-92.

[37] Li AX, Sun X, Liu LJ. Action of salicylic acid on plant growth [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 878076.

[38] Katsir L, Chung HS, Koo AJ, et al. Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing [J]. Curr Opin Plant Biol, 2008, 11(4): 428-435.

[39] Liao XG, Lovett B, Fang WG, et al. *Metarhizium robertsii* produces indole-3-acetic acid, which promotes root growth in *Arabidopsis* and enhances virulence to insects [J]. Microbiology, 2017, 163(7): 980-991.

[40] Proietti S, Falconieri GS, Bertini L, et al. *Beauveria bassiana* rewires molecular mechanisms related to growth and defense in tomato [J]. J Exp Bot, 2023, 74(14): 4225-4243.

[41] Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, et al. Induced systemic resistance by beneficial microbes [J]. Annu Rev Phytopathol, 2014, 52: 347-375.

[42] González-Mas N, Gutiérrez-Sánchez F, Sánchez-Ortiz A, et al. Endophytic colonization by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* affects plant volatile emissions in the presence or absence of chewing and sap-sucking insects [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 660460.

[43] Wang X, Yan GW, Liu WJ, et al. Endophytic *Beauveria bassiana* of tomato resisted the damage from whitefly *Bemisia tabaci* by mediating the accumulation of plant-specialized metabolites [J]. J Agric Food Chem, 2023, 71(36): 13244-13254.

[44] Wei QY, Li YY, Xu C, et al. Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* increases the resistance of tomatoes against *Bemisia*

tabaci [J]. Arthropod Plant Interact, 2020, 14(3): 289-300.

[45] Liu MY, Xiang D, Hokkanen HMT, et al. *Beauveria bassiana* induces strong defense and increases resistance in tomato to *Bemisia tabaci* [J]. JoF, 2025, 11(2): 141.

[46] Chang YM, Xia XY, Sui L, et al. Endophytic colonization of entomopathogenic fungi increases plant disease resistance by changing the endophytic bacterial community [J]. J Basic Microbiol, 2021, 61(12): 1098-1112.

[47] Bigeard J, Colcombet J, Hirt H. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI) [J]. Mol Plant, 2015, 8(4): 521-539.

[48] Yang YX, Ahammed G, Wu CJ, et al. Crosstalk among jasmonate, salicylate and ethylene signaling pathways in plant disease and immune responses [J]. Curr Protein Pept Sci, 2015, 16(5): 450-461.

[49] Barra-Bucarei L, González MG, Iglesias AF, et al. *Beauveria bassiana* multifunction as an endophyte: growth promotion and biologic control of *Trialeurodes vaporariorum*, (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) in tomato [J]. Insects, 2020, 11(9): 591.

[50] Ma Y, Chen SH, Liu S, et al. Phosphate solubilizing fungi enhance insoluble phosphate dissolution via organic acid production: mechanisms and applications [J]. Front Microbiol, 2025, 16: 1600231.

[51] Raya-Díaz S, Sánchez-Rodríguez AR, Segura-Fernández JM, et al. Entomopathogenic fungi-based mechanisms for improved Fe nutrition in sorghum plants grown on calcareous substrates [J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0185903.

[52] Ortiz-Urquiza A. The split personality of *Beauveria bassiana*: understanding the molecular basis of fungal parasitism and mutualism [J]. mSystems, 2021, 6(4): e0076621.

[53] Behie SW, Zelisko PM, Bidochka MJ. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants [J]. Science, 2012, 336(6088): 1576-1577.

[54] McKinnon AC, Glare TR, Ridgway HJ, et al. Detection of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the rhizosphere of wound-stressed *Zea mays* plants [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 1161.

[55] Zhao JQ, Xiang D, Wang J, et al. *Beauveria bassiana*triggers the tomato 'cry for help' mechanism to assemble pest-suppressing rhizomicrobiome [J]. Plant J, 2025, 124(6): e70646.

[56] Canfora L, Tartanus M, Manfredini A, et al. The impact of *Beauveria* species bioinocula on the soil microbial community structure in organic strawberry plantations [J]. Front Microbiol, 2023, 13: 1073386.

[57] Camele I, Sadeek SA, Racioppi R, et al. Antimicrobial activity of diffusible and volatile metabolites emitted by *Beauveria bassiana*: chemical profile of volatile organic compounds (VOCs) using SPME-GC/MS analysis [J]. Plants, 2023, 12(15): 2854.

[58] 许绍欢, 许忠顺, 杜飞, 等. 混合接种球孢白僵菌与摩西球囊霉对烟草促生抗逆影响 [J]. 菌物学报, 2021, 40(8): 2191-2200.
Xu SH, Xu ZS, Du F, et al. Effects of mixed inoculation of *Beauveria bassiana* and *Glomus mosseae* on tobacco growth and stress resistance [J]. Mycosystema, 2021, 40(8): 2191-2200.

[59] Papantzikos V, Mantzoukas S, Koutsompina A, et al. Use of *Beauveria bassiana* and *Bacillus amyloliquefaciens* strains as *Gossypium hirsutum* seed coatings: evaluation of the bioinsecticidal and biostimulant effects in semi-field conditions [J]. Agronomy, 2024, 14(10): 2335.

[60] 王华, 王岩青, 唐玲, 等. 大生态治理小害虫 [J]. 农业知识, 2020 (15): 14-16.
Wang H, Wang YQ, Tang L, et al. Tackling small pests with big ecological solutions [J]. Agriculture Knowlege, 2020(15): 14-16.

[61] 中华人民共和国农业农村部. 2025年园艺作物重大病虫害防控技术方案[EB/OL]. 2025-02-28. https://www.moa.gov.cn/xw/zxfb/202502/t20250228_6470757.htm
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Technical Plan for the Prevention and Control of Major Diseases and Pests of Horticultural Crops (2025)[EB/OL]. 2025-02-28. https://www.moa.gov.cn/xw/zxfb/202502/t20250228_6470757.htm

[62] 北京市怀柔区人民政府. 北京市农业推广站专家赴怀柔北房镇园区开展技术指导[EB/OL]. 2025-09-12. https://www.bjhr.gov.cn/ywdt/hrkx/202509/t20250912_4200848.html.
People's Government of Huairou District, Beijing. Experts from the Beijing Municipal Agricultural Technology Extension Station Visit Agricultural Parks in Beifang Town, Huairou District to Provide Technical Guidance[EB/OL]. 2025-09-12. https://www.bjhr.gov.cn/ywdt/hrkx/202509/t20250912_4200848.html.

[63] Cárdenas OGG, Madrigal HC, Garzón A. Use and impact of endophytic entomopathogenic fungi: Their potential in the context of agricultural sustainability [J]. Biotecnia, 2024, 26: 507-516.

[64] Haron EN, Hassan DMA, El-Said E, et al. Colonization effect of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. on tomato plant and *Bemisia tabaci* [J]. Sci Rep, 2025, 15: 17067.

[65] Awan UA, Meng LX, Xia S, et al. Isolation, fermentation, and formulation of entomopathogenic fungi virulent against adults of *Diaphorina citri* [J]. Pest Manag Sci, 2021, 77(9): 4040-4053.

[66] Yong Lee J, Mi Woo R, Dong Woo S. Formulation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* JN5R1W1 for the control of mosquito adults and evaluation of its novel applicability [J]. J Asia Pac Entomol, 2023, 26(2): 102056.

[67] Oecd. Consensus document on *Beauveria bassiana* strains as microbial plant protection product: Regulatory considerations for *Beauveria bassiana* strains [M]. Paris: OECD Publishing, 2025.

[68] Mascarin GM, Golo PS, de Souza Ribeiro-Silva C, et al. Advances in submerged liquid fermentation and formulation of entomopathogenic fungi [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2024, 108: 451.

[69] Faria M, Hajek AE, Wraight SP. Imbibitional damage in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium acridum*,

and *Metarhizium anisopliae* [J]. Biol Control, 2009, 51(3): 346-354.

[70] Motholo LF, Booyse M, Hatting JL, et al. Comparison of wheat growth-response to endophytic *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) derived from an insect versus plant host [J]. Aust J Crop Sci, 2019(13(11): 2019): 1793-1802.

[71] Chang YM, Lin X, Sui J, et al. Endophytic *Beauveria* spp. enhance tomato growth and resistance to *Botrytis cinerea* via transcriptomic regulation [J]. JoF, 2025, 11(11): 799.

[72] González-Mas N, Valverde-García R, Gutiérrez-Sánchez F, et al. Effect of passage through the plant on virulence and endophytic behavioural adaptation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* [J]. Biol Control, 2021, 160: 104687.

[73] Jaber LR, Ownley BH. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? [J]. Biol Control, 2018, 116: 36-45.

[74] Xiao GH, Ying SH, Zheng P, et al. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana* [J]. Sci Rep, 2012, 2: 483.

[75] Wang QG, Xu LJ. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review [J]. Molecules, 2012, 17(3): 2367-2377.

[76] 陈文文, 胡美变, 彭伟, 等. 僵蚕中有效成分白僵菌素的研究进展 [J]. 中国药房, 2019, 30(24): 3452-3456.
Chen WW, Hu MB, Peng W, et al. Research progress of beauverin, an effective component in *Bombyx batryticatus* [J]. China Pharm, 2019, 30(24): 3452-3456.

[77] Elgar SA, Villari C, Fair CG, et al. Beauvericin production by endophytic and epiphytic *Beauveria bassiana* in peach (*Prunus persica*) and implications for insect biocontrol [J]. Front Fungal Biol, 2025, 6: 1714008.

[78] Authority European Food Safety. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substances *Beauveria bassiana* strains ATCC-74040 and GHA [J]. EFSA J, 2013, 11(1): 3031.

[79] Cappa F, Baracchi D. Bioinsecticides on honey bees: Exposure, sublethal effects, and risk assessment paradigms [J]. Curr Opin Environ Sci Health, 2024, 41: 100569.

[80] Tucker DL, Beresford CH, Sigler L, et al. Disseminated *Beauveria bassiana* infection in a patient with acute lymphoblastic leukemia [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(11): 5412-5414.

[81] Henke MO, de Hoog GS, Gross U, et al. Human deep tissue infection with an entomopathogenic *Beauveria* species [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(7): 2698-2702.

[82] Knutsson KA, Rama P, Tombolini B, et al. *Beauveria bassiana* keratitis: a case series and review of literature [J]. J Clin Med, 2023, 12(24): 7601.

[83] Oecd. OECD Guidance to the Environmental Safety Evaluation of Microbial Biocontrol Agents [M]. Paris: OECD, 2014.

[84] Valero-Jiménez CA, Faino L, Spring in't Veld D, et al. Comparative genomics of *Beauveria bassiana*: uncovering signatures of virulence against mosquitoes [J]. BMC Genom, 2016, 17: 986.

[85] Chen JJ, Lai YL, Wang LL, et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient genome editing via blastospore-based transformation in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* [J]. Sci Rep, 2017, 7: 45763.

[86] Wang YN, Zou XW, Zhu XM, et al. The PKS-NRPS gene BBA_09856 deletion mutant of *Beauveria bassiana* enhanced its virulence against *Ostrinia furnacalis* larvae and strengthened the host plant's resistance to *Botrytis cinerea* as an endotype [J]. JoF, 2025, 11(3): 197.

[87] Zhang YJ, Zhao JH, Fang WG, et al. Mitogen-activated protein kinase hog1 in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* regulates environmental stress responses and virulence to insects [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(11): 3787-3795.

[88] Fang WG, Leng B, Xiao YH, et al. Cloning of *Beauveria bassiana* Chitinase Gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(1): 363-370.

[89] Marco S, Loredana M, Riccardo V, et al. Microbe-assisted crop improvement: a sustainable weapon to restore holobiont functionality and resilience [J]. Hortic Res, 2022, 9: uhac160.

[90] Nerva L, Sandrini M, Moffa L, et al. Breeding toward improved ecological plant-microbiome interactions [J]. Trends Plant Sci, 2022, 27(11): 1134-1143.

[91] Biryol S, Araz Sayın N, Aktürk R, et al. Target and non-target impact of oil-based *Beauveria bassiana* formulation in controlling forest insect pests [J]. J Pest Sci, 2025, 98(4): 2129-2144.

[92] Jensen RE, Cabral C, Enkegaard A, et al. Influence of the plant interacting entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on parasitoid host choice-behavior, development, and plant defense pathways [J]. PLoS One, 2020, 15(9): e0238943.

（责任编辑　朱琳峰）

生物技术通报
· 综述与专论 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):35-44

橡胶树抗寒相关转录因子研究进展

刘妮 李陈万里 牛迎凤 毛常丽* 柳觐*
（1.热带作物生物育种全国重点实验室,西双版纳 666100; 2.云南省天然橡胶可持续利用研究重点实验室,西双版纳 666100; 3.云南省热带作物科学研究所,西双版纳 666100）

摘 要： 橡胶树（*Hevea brasiliensis*）是天然橡胶的核心来源，其抗寒能力的提升对打破种植区域限制、保障产业长期发展具有至关重要的战略意义。近年来，随着橡胶树的全基因组测序和多组学技术的突破性进展，其响应低温胁迫的分子调控机制已迈入系统整合的阶段，其中以转录因子为核心的级联调控网络成为关键突破点。本文系统总结了ICE、CBF和AP2/ERF等转录因子通过识别MYC、DRE/CRT等顺式作用元件激活下游冷响应基因的分子机制，明确了ICE-CBF级联信号通路在低温信号转导中的枢纽地位。在此基础上，进一步整合了脱落酸、乙烯、茉莉酸等激素信号通路，以及DNA甲基化、组蛋白修饰等表观遗传修饰机制，逐步构建起以转录因子主导、多维度协同作用的调控框架。最后，针对未来研究提出了增加其他关键转录因子功能验证、多组学联合分析、非编码RNA调控等方向，以期为橡胶树抗寒种质的分子设计提供理论支撑。

关键词： 橡胶树；抗寒性；转录因子；植物激素；表观遗传
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0157

Research Progress in Cold-resistant Transcription Factors of *Hevea brasiliensis*

LIU Ni LI Chen-wan-li NIU Ying-feng MAO Chang-li* LIU Jin*
（1. *National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding, Xishuangbanna* 666100; 2. *Yunnan Key Laboratory of Sustainable Utilization Research on Rubber Tree, Xishuangbanna* 666100; 3. *Yunnan Institute of Tropical Crops, Xishuangbanna* 666100）

Abstract: *Hevea brasiliensis* is the primary source of natural rubber. Enhancing its cold resistance is critically important for overcoming geographical planting limitations and ensuring the long-term development of the rubber industry. In recent years, with significant advances in rubber tree whole-genome sequencing and multi-omics technologies, the molecular regulation mechanisms underlying its response to low-temperature stress have gradually entered a stage of systematic integration. Among these mechanisms, the cascade regulatory network constructed by transcription factors is emerging as a key breakthrough. This review systematically summarizes the molecular mechanisms by which transcription factors, including ICE, CBF, and AP2/ERF families, activate downstream cold-responsive genes through binding to *cis*-regulatory elements like MYC and DRE/CRT. It further clarifies the pivotal role of the ICE-CBF cascade signaling pathway in low-temperature signal transduction. Building on this, it integrates regulatory mechanisms of hormonal signaling pathways (abscisic acid, ethylene, jasmonic acid, etc.) and epigenetic regulation (DNA methylation and histone modification, etc.), thereby gradually constructing a regulatory framework dominated by transcription factors and multi-dimensional synergy. Looking to the future, we should focus on enhancing the functional validation of other key transcription factors, conducting joint multi-omics analyses, and exploring non-coding RNA regulation, thereby providing theoretical support for the molecular design of cold-resistant germplasms in *Hevea brasiliensis*.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; cold tolerance; transcription factor; phytohormone; epigenetic regulation

收稿日期：2026-01-31
基金项目：云南省天然橡胶可持续利用研究重点实验室（202405AG340001），热带作物生物育种全国重点实验室重点课题（NKLTCB-YAAS-2024-R01），云南省技术创新人才培养对象项目（202305AD160023），省所热带作物科技创新专项资金（RF2026-2），云南省农业联合专项（202501BD070001-114）
*通信作者：毛常丽 maokangwan@163.com，柳觐 liujin06@126.com

巴西橡胶树（*Hevea brasiliensis*）是战略物资天然橡胶的主要来源。该树种原产于亚马逊河流域赤道附近的热带雨林，经长期自然选择形成喜高温、忌低温的生理特性[1]。我国部分植胶区位于热带北缘气候带，频繁发生的极端低温事件使寒害成为制约橡胶树栽培扩展与产业可持续发展的关键因素[2]。低温胁迫对橡胶树的危害呈现多维度特征：生理层面表现为顶部嫩梢及嫩芽出现黑斑、嫩叶枯焦、成熟叶片枯死、树皮爆皮流胶及根系腐烂；生产层面则易诱发小蠹虫等次生虫害，导致橡胶产量锐减，严重时甚至整株死亡[3-4]。在气候变化与种植区域扩展的双重挑战下，提升橡胶树对低温环境的适应性，不仅可拓宽其适宜种植范围，更能从源头保障天然橡胶的稳定供给，为产业链的可持续发展奠定坚实基础。因此，深入研究橡胶树的抗寒机制并培育抗寒橡胶树种质尤为重要。

植物在应对低温等非生物胁迫时，演化出多种复杂的防御体系。在该体系中，转录因子通过调控网络诱导相关功能基因表达：一方面激活渗透调节相关基因，促进脯氨酸、甜菜碱和可溶性糖等渗透调节物质的累积，从而维持细胞稳态[5]；另一方面激活超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）、过氧化物酶（peroxidase, POD）和过氧化氢酶（catalase, CAT）等抗氧化酶系统，并与抗坏血酸、谷胱甘肽和类黄酮等非酶抗氧化物质协同作用，共同清除活性氧、减轻氧化损伤[6-7]。橡胶树作为典型的热带经济作物，其抗寒机制研究长期受到广泛关注。目前，基于组学数据已挖掘出大量潜在的相关转录因子，但受限于木本植物遗传转化体系的不完善，多数抗寒基因的功能仍停留在组学预测、表达量分析和依赖模式植物异源验证的阶段，在橡胶树自身遗传背景下的系统性功能研究仍显不足[8]。本文综述了橡胶树抗寒相关转录因子的鉴定与功能研究，进一步分析了其调控网络构成，并对橡胶树抗寒分子机理及网络构建的研究方向进行展望。

1 橡胶树早期响应低温的分子机制

橡胶树低温早期应答是一套有序的多层次分子调控体系，下文将依次从低温信号感知与级联转导、核心ICE-CBF-COR信号通路、橡胶树特有低温应答特征与多通路协同调控网络三方面系统阐述其分子响应规律。

植物对低温胁迫的早期分子响应是一个高度有序的过程，涉及信号感知、级联信号传导与基因表达重编程。该过程始于细胞膜物理特性的改变（如膜流动性降低），低温信号由此被感知，进而触发Ca^{2+}内流等第二信使事件[9-10]。随后，钙依赖蛋白激酶（calcium-dependent protein kinase，CDPKs）及丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）介导的磷酸化级联反应被激活，最终诱导下游抗寒相关基因的表达[11]。

在上述调控网络中，ICE-CBF-COR通路是目前研究较为系统、功能较为明确的核心信号途径之一。该通路中，CBF表达诱导因子（inducer of CBF expression，ICE）主要通过结合*CBF*基因启动子中的MYC顺式元件（CANNTG）驱动*CBF*转录[12]；CBF蛋白继而识别下游冷调节基因（cold-regulated genes，CORs）启动子区的CRT/DRE元件，激活一系列增强细胞膜稳定性与渗透调节能力的保护性基因[13-14]。

橡胶树的低温响应呈现出明确的温度阈值特征。现有研究表明，10 ℃与15 ℃是触发橡胶树转录重编程的关键温度阈值，在短期（1–4 h）低温处理下，可诱导大量差异表达基因的协同响应，构成快速应答网络；然而在4 ℃极端低温下，部分抗寒相关基因的表达反而受到抑制[15]，这一现象为解析特定基因型低温敏感的分子机制提供了切入点，提示不同温度区间可能激活差异化的信号通路与调控模块。

在激素层面，乙烯（ethylene, ET）与吲哚乙酸（indole-3-acetic acid, IAA）信号通路动态参与抗氧化防御等生理过程[16]。多组学联合分析进一步揭示，在低温胁迫早期应答阶段，色氨酸代谢途径、细胞壁修饰相关基因（如*XTH23*、扩展蛋白基因）以及抗氧化系统基因呈现显著富集，共同构建快速响应的分子网络；同时，低温胁迫迅速抑制光合碳固定效率，并促进可溶性糖、脯氨酸等渗透调节物质以及类黄酮、花青素等次生代谢物的积累[17]，从而形成独特的低温适应代谢网络。

2 橡胶树抗寒相关转录因子的鉴定与功能研究进展

2.1 ICE-CBF核心信号转录因子通路

2.1.1 ICE：低温信号的上游分子开关

ICE作为低

温响应级联的上游转录因子，含有典型的螺旋–环–螺旋（basic helix-loop-helix, bHLH）结构域，属于bHLH转录因子家族[12]。在低温信号传递过程中，ICE可视为关键的分子开关，在橡胶树抗低温胁迫中发挥重要作用。Yuan等[18]通过在拟南芥中过表达*HbICE1*基因，发现转基因植株在低温胁迫下存活率显著提高，同时伴随电解质渗漏率和MDA含量降低，脯氨酸含量增加，ROS积累量减少，初步证实了*HbICE1*在抗寒中的积极作用。

进一步对ICE家族成员的分析表明，在耐寒品种‘93-114’中，*HbICE1*、*HbICE2*、*HbICE3*和*HbICE5*基因的表达量显著高于不耐寒品种‘热垦501’；除*HbICE5*外，ICE家族其余成员基因在低温条件下均能被诱导表达上调，表明其参与低温响应的分子调控网络。通过异源过表达橡胶树5个*ICE*基因的实验表明，除*HbICE3*外，过表达其余4个基因均显著提升拟南芥的抗寒性[19]。这些结果表明，HbICE转录因子是橡胶树低温胁迫响应的正向调控因子。

2.1.2　CBF：抗寒信号转导的核心枢纽　CBF作为植物抗寒信号转导的核心枢纽，最早在拟南芥中被鉴定为ICE诱导表达的特异性转录因子，其隶属于AP2/ERF超家族，家族成员均含有由60–70个氨基酸组成的AP2/ERF保守结构域，该结构域可特异性识别下游靶基因的顺式作用元件并激活其表达，从而在低温响应中发挥关键调控作用[20–21]。Cheng等[13]通过RT-qPCR和Southern blot分析*HbCBF1*基因的表达模式，并利用酵母单杂交与凝胶迁移率实验证实其可与CRT/DRE（TACCGACAT/TGGCCGAC）顺式作用元件结合，在拟南芥中过表达*HbCBF1*能上调*COR*基因表达，显著增强植株的抗寒能力。进一步研究发现，在耐寒品种‘热研7-33-97’中*HbCBF1*、*HbCBF2*和*HbCBF3*基因的表达水平均显著高于不耐寒品种‘热研7-20-59’，且这些基因在低温胁迫下均可被诱导表达[22]。上述结果证实，HbCBF能直接激活一系列抗寒功能基因，在橡胶树抗寒响应中发挥关键作用。

2.1.3　ICE-CBF通路的多因子协同调控与局限性　该通路还受到多因子协同调控，包括钙调蛋白结合转录激活因子3（calmodulin-binding transcription activator 3, CAMTA3）的正向激活[23]、乙烯不敏因子3（ethylene-insensitive 3, EIN3）的负向抑制[24–25]以及MYB转录因子家族成员参与的协同调节[26]等多重调控模块的精密控制。在激素网络层面，脱落酸（abscisic acid, ABA）介导的信号级联对ICE-CBF-COR核心通路发挥正向调控作用[27]。需特别指出的是，植物抗寒转录调控网络中亦存在不依赖ICE-CBF-COR通路的调控机制[28]，表明植物低温响应具有更为复杂的调控层级。

综上所述，ICE-CBF级联模块作为橡胶树抗寒响应的核心通路，其调控的基因仅占全部低温应答基因的一部分，这一特性揭示了抗寒网络的复杂性。

2.2　ABA信号通路中的转录因子

除ICE-CBF核心模块外，ABA作为逆境信号分子，在植物低温信号传导中可分为ABA依赖与ABA非依赖两条信号通路，二者均可汇聚于ICE-CBF-COR信号通路，共同参与低温应答[29]。

ABA依赖通路的核心信号转导机制为：ABA受体PYR/PYL家族感知低温信号后，通过抑制磷酸酶PP2C活性，继而激活SnRK2激酶，后者磷酸化AREB/ABF等bZIP类转录因子，进而启动下游基因表达[30]。橡胶树种质间存在显著差异化的ABA响应模式。冷敏感种质‘热垦501’中，ABA受体基因*PYL9*及*ARF*家族成员呈现上调表达特征[31]；抗寒品种‘RRIM600’则表现为*PYR1*和*PYL4*基因特异性上调[32]。在‘热研7-33-97’中，*ABF/ABI5*基因表达受冷胁迫抑制，而*MYB88*、*MYB82*、*MYB38*、*MYB17*等多个MYB家族成员虽受低温诱导表达，但其具体功能尚不明确[15]。在抗寒种质‘93-114’中，*HbEBP1*基因亦受低温和ABA诱导上调，其在拟南芥中过表达可显著增强抗寒性并激活*HbRD22*表达[33]。

进一步功能分析发现，在抗寒种质‘93-114’中ABA依赖信号通路的激活不完全，具体表现为MYC/MYB途径、NAC途径及AREB1途径均未实现完全激活[16]。该现象提示，橡胶树不同种质间抗寒性差异可能与ABA信号通路有关。

2.3　其他应激响应转录因子

除上述通路外，ERF、WRKY、HSF及NAC等多个转录因子家族亦被证实参与橡胶树的低温应答，

共同构成复杂的抗寒调控网络。

乙烯响应因子（ethylene response factor, ERF）是AP2/ERF超家族的核心功能亚群，通过特异识别顺式作用元件GCC-box（核心序列GCCGCC），在调控植物防御反应中发挥关键作用[29]。在橡胶树中，该家族成员具有多样性与组织特异性表达特征。Duan等[34]通过整合转录组学与基因组学数据，对根、叶、树皮、乳胶及胚胎组织五大组织的AP2/ERF家族进行保守结构域特征分析与系统发育拓扑结构解析，共鉴定出142个AP2/ERF家族成员，并根据进化分支将其划分为11个亚家族。Putranto等[35]进一步研究发现，47个*HbERF*基因中多个成员在低温处理后表达显著变化。功能验证方面，Lestari等[36]通过遗传转化获得了过表达*HbERF-IXc5*基因的橡胶树愈伤组织株系（TS19A90、TS20A60和TS20A75），这些株系在多种非生物胁迫下均表现出增强的抗性，其中TS20A60和TS20A75在低温胁迫下的抗寒性表现尤为突出；*HbERF1*基因在4 ℃低温胁迫下呈现时间依赖性上调表达，在拟南芥中过表达该基因可显著激活*COR15α*的表达并增强植株抗寒性[37]；HbERF109蛋白则被证实与抗氧化酶Hb-SOD和HbAPX存在相互作用，暗示其可能通过调节活性氧清除系统增强抗逆性[38]。此外，茉莉酸通路关键基因*MYC2*在不抗寒种质‘热垦501’与‘CATAS93-114’中均呈现低温诱导上调表达特征，同时伴随冷响应标志基因*RD22*的上调及ABA信号关键调控因子*AREB2*的表达下调[16]。表明*MYC2*基因可能参与ABA与茉莉酸通路来调控植物抗低温胁迫能力。

WRKY家族成员在低温信号整合中展现显著调控活性。研究显示，*HbWRKY7*和*HbWRKY11*受低温诱导表达，其中*HbWRKY7*的响应强度尤为突出，在10 ℃低温驯化条件下其表达量呈持续上升趋势；二者对ABA、SA、JA和H_2O_2等信号分子的响应模式存在组织特异性差异，叶片组织中的信号响应强度显著高于树皮组织[39]。另有研究表明*HbWRKY82*基因可能调控多个应激响应基因、ROS代谢相关基因以及激素信号基因的表达，参与低温应答网络调控[40]。

热激转录因子（heat shock transcription factors, HSF）在胁迫应答网络中扮演关键角色。实验证实，*HbHsfA4a*等成员在抗寒种质‘93-114’中低温诱导后持续高表达且显著高于不抗寒种质‘热垦501’，而*HbHsfA3b*、*HbHsfA4d*等成员亦呈现胁迫上调特征，提示其可能协同参与阶段性抗寒调控[41-42]。尽管这些表达特征已通过实验验证，但其具体抗寒调控机制仍需进一步解析。

NAC家族成员在低温应答中同样表现活跃。*HbNAC26*和*HbNAC11*均受低温显著诱导表达，功能验证实验表明，在缺陷型酵母中异源过表达*HbNAC11*可显著增强其抗寒性，明确该基因为橡胶树低温应答的正向调控因子[43]。

上述研究成果为解析橡胶树转录因子级联调控网络提供了关键分子标记，并奠定抗寒品种分子设计育种的实验基础。表1系统汇总了已功能验证的核心抗寒转录因子，以期为后续研究提供清晰的分子参照与功能索引。

3 橡胶树关键抗寒转录因子的调控机制

植物应对低温胁迫的调控网络构建，不仅依赖于转录因子与多种信号通路的协同作用，更体现在各层次调控机制之间的动态整合[45]。在此体系中，转录因子发挥核心枢纽功能：其通过级联反应放大低温信号，同时整合激素信号转导途径与表观遗传修饰机制，最终实现对低温胁迫的精准响应。

3.1 转录因子与激素信号通路的交互调控

植物激素作为内源性信号整合分子，在低温胁迫下通过信号重编程动态调控基因表达与代谢流分布[46]。橡胶树低温转录组数据揭示，其抗寒响应伴随ABA、茉莉酸（jasmonate, JA）、乙烯等多激素信号网络的协同调控。

ABA作为关键的胁迫激素，其代谢稳态与信号强度在不同橡胶树种质间存在差异[16]。在分子调控层面，ABA信号通过蔗糖非酵解型蛋白激酶2（sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 2, SnRK2）家族成员*HbSnRK2.6A/B*实现信号传递。这些激酶基因在ABA与低温双重诱导下表达上调，通过与HbICE2蛋白发生特异性相互作用，促进*HbCBF1*基因表达，从而正向调控抗寒性[27]。与之相反的是，*HbSnRK2.7*基因在持续低温下表达量显著降低，且在不耐寒种质中持续高表达，表明其可能是ABA信号通路的负调控因子[47]。

表1　橡胶树中已验证功能的抗寒相关转录因子

Table 1　Functionally validated cold-resistant transcription factors in rubber trees

家族 Family	基因 Gene	表达模式 Expression pattern	功能验证方法 Functional validation method	已知/预测功能 Known/Predicted function	参考文献 References
bHLH	*HbICE1*	树皮中丰度最高；叶片中受低温(4–10 ℃)快速诱导；在耐寒品种中表达量更高	RT-qPCR；拟南芥/烟草异源过表达(增强抗寒性)；酵母单杂交实验(与*MYC*序列结合)；酵母双杂交实验(与HbBIN2互作)	低温信号转导的上游正调控因子，激活*CBF*表达；介导BR信号与低温信号的互作网络	[18–19]
	HbICE2	受低温与ABA协同诱导	RT-qPCR；拟南芥/烟草异源过表达(增强抗寒性)；酵母单杂交(结合*HbDREB1*启动子)；酵母双杂交与BiFC(与HbJAZ1/HbJAZ12、HbSnRK2.6互作)	激活*HbCBF1*表达；介导ABA和JA信号与低温信号的互作网络	[19, 27, 44]
	HbICE3	在部分耐寒种质中受低温诱导	RT-qPCR；拟南芥异源过表达(效果不显著)；酵母单杂交(结合*HbDREB1*启动子)	激活*HbDREB1*表达；功能可能存在种质特异性	[19]
	HbICE4	在部分耐寒种质中受低温诱导	RT-qPCR；拟南芥/烟草异源过表达(增强抗寒性)	激活*HbDREB21*表达	[19]
	HbICE5	品种间基础表达存在差异，对低温诱导不敏感	RT-qPCR；拟南芥/烟草异源过表达(增强抗寒性)	具有正向抗寒功能	[19]
EIN3/EIL	*HbEIN3-1/2*	乙烯通路诱导表达	橡胶树原生质体验证；酵母单杂；EMSA；双荧光素酶活检测；酵母双杂；BiFC；拟南芥异源表达(减弱抗寒性)	具有负向抗寒功能，与*HbCBF1*基因启动子结合和ICE2蛋白互作	[24]
AP2/ERF	*HbCBF1*	受HbICE诱导，低温下强烈上调表达	RT-qPCR；酵母单杂交/EMSA；拟南芥异源过表达(增强抗寒性)	核心调控枢纽，直接结合*COR*基因启动子DRE/CRT元件	[13, 22]
	HbCBF2	受低温诱导表达	RT-qPCR	推测为核心正调控因子	[22]
	HbCBF3	耐寒品种低温诱导表达更显著	RT-qPCR	正调控因子，其表达差异可能与品种抗性相关	[22]
	HbERF-IXc5	受低温、乙烯诱导	RT-qPCR；橡胶树愈伤组织过表达(增强对低温、干旱等多重非生物胁迫的抗性)	介导乙烯信号与胁迫信号的互作网络，正调控抗寒性	[36]
	HbERF1	受低温、干燥、激素诱导	RT-qPCR；拟南芥异源过表达(增强抗寒性)	激活*COR15α*表达	[37]
	HbERF109	受生物和非生物胁迫诱导	酵母双杂交；BiFC(与HbSOD、HbAPX互作)	可能通过调节抗氧化防御系统，参与低温应答	[38]
WRKY	*WRKY7*	受低温诱导表达	RT-qPCR；拟南芥异源过表达(增强抗寒性)	激活*COR15α*表达	[39]
	WRKY11	受低温诱导表达	RT-qPCR；拟南芥异源过表达(增强抗寒性)	激活*COR15α*表达	[39]
HSF	*HbHsfA4a*	存在种质差异，耐寒品种低温诱导表达更显著	RT-qPCR	推测参与热激及低温胁迫调控	[41]
NAC	*HbNAC11*	受低温诱导上调表达	RT-qPCR；缺陷型酵母异源过表达(增强抗寒性)	推测为橡胶树低温应答的正向调控因子	[43]

ET信号在抗寒调控中则表现出双向作用。一方面，乙烯能诱导热激蛋白Hsp70参与橡胶树的抗寒响应[48]；同时诱导乙烯响应因子*HbERF-IXc5*表达，通过调控ROS清除系统及乙烯/茉莉酸通路增强抗寒性[32]；另一方面，乙烯信号的关键转录因子HbEIN3-1/2既能特异性识别并结合*HbCBF1*基因启动子区的DRE元件，抑制其转录活性，又能与HbICE2蛋白相互作用，并显著抑制该蛋白转录功能，从而负向调控橡胶树抗寒性[24]。

JA信号通路同样参与协同激活过程。橡胶树转录组数据显示，冷胁迫可激活COI1-JAZ-MYC/bHLH/ICE1-DREB/CBF/EREBP构成的JA信号级联反

应[31]。外源茉莉酸甲酯处理能显著诱导*HbCBF1*、*HbCBF2*和*HbCOR47*等基因的表达，但该通路的负调控因子HbJAZ1/12通过与HbICE2蛋白相互作用抑制其转录活性，从而降低橡胶树的抗寒能力[43]。此外，油菜素类固醇（brassinosteroids，BR）信号通路参与抗寒负调控过程。研究表明，低温胁迫诱导其负调控因子HbBIN2-1/3与HbICE1相互作用，从而显著抑制其转录活性，导致ROS和MDA含量积累，最终降低植株的抗寒性[49]。

综合上述调控机制，橡胶树通过协同激活JA、ABA和BR信号通路，同时抑制生长素和ET信号通路传导，并增强ROS清除系统功能，构建了多维整合型激素调控网络以实现低温胁迫响应的精密调控[50]。这些激素信号并非孤立运作，而是形成复杂的交叉互作网络，通过协同调节ICE、CBF等核心转录因子的时空表达模式与蛋白活性动态，实现对低温适应响应的精确时序控制与强度调控。

3.2 关键转录因子的表观遗传调控机制

表观遗传调控在植物逆境适应中扮演核心调控角色，其通过可逆的化学修饰实现基因表达时空特异性调控，赋予植物表型可塑性以应对环境波动[51]。橡胶树抗寒性状的形成同样依赖于多层级表观遗传重塑网络，涵盖DNA甲基化动态平衡与组蛋白共价修饰等精密调控维度[52]。

早期研究揭示，在不同气候梯度下，橡胶树次生代谢关键基因调控区CpG岛甲基化模式呈现显著异质性，这种表观遗传标记的时空特异性分布与植株抗寒能力存在显著相关性[53]。后续机制研究表明，低温胁迫能激活橡胶树中去甲基化酶基因（如*HbDME*、*HbROS*和*HbDML*）的表达，这些酶通过靶向催化*HbICE1*、*HbCBF2*和*HbMET*等抗寒核心基因启动子区高密度CpG岛的特异性去甲基化修饰，有效促进染色质结构松散化与转录因子结合位点的暴露，从而显著提升靶基因的转录活性与表达丰度[54]。

组蛋白修饰同样调控抗寒基因的表达。以耐寒种质‘热研7-33-97’为研究模型，低温胁迫可触发*HbCBF1*和*HbCBF2*基因转录起始位点区域发生特征性组蛋白修饰重塑：激活型标记H3K4me3呈现渐进式减少，而抑制型标记H3K27me3则显著富集，这种修饰模式的动态转变与*CBF*基因转录活性抑制存在显著的表观–基因表达调控关系[55]。

此外，蛋白质的翻译后修饰（如磷酸化）是快速调节转录因子活性的重要机制。在模式植物中，BIN2等激酶通过磷酸化修饰ICE1蛋白影响其稳定性与活性[56]。在橡胶树中，类似HbBIN2修饰HbICE1蛋白的调控机制仍有待进一步实验验证。

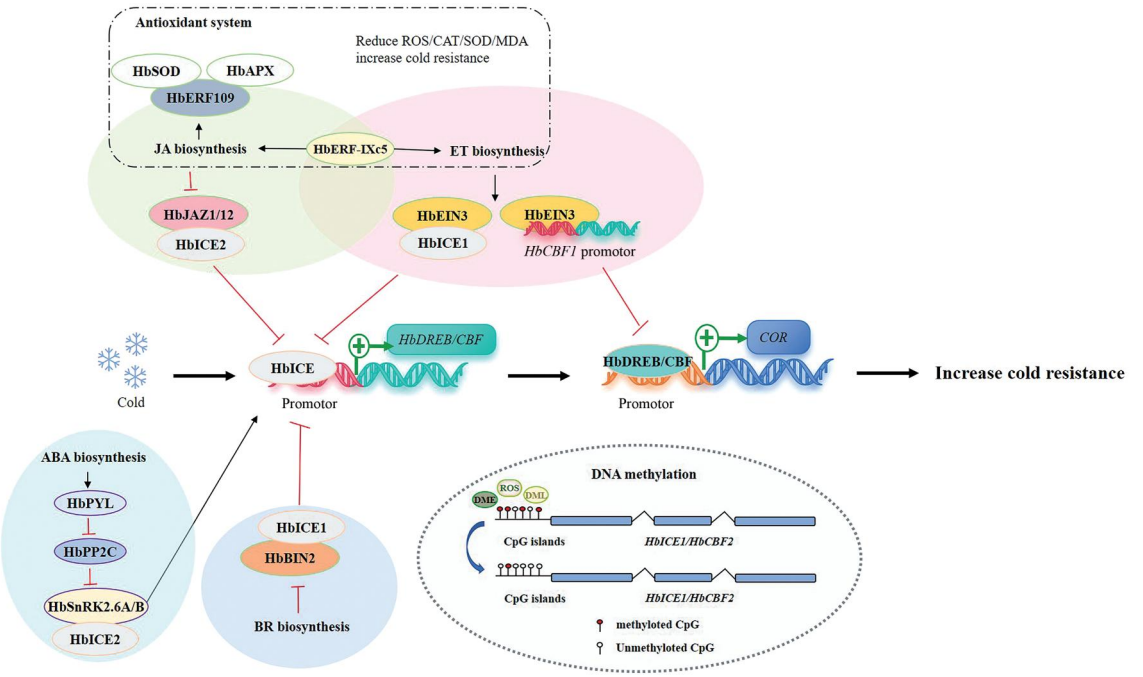
这些DNA甲基化、组蛋白修饰及蛋白磷酸化等表观遗传机制相互交织，并与转录调控及激素信号网络整合，共同构成一个多抗寒性维度的精准调控系统，最终实现橡胶树抗寒性状的适应性表达。橡胶树抗寒性相关转录因子的多维调控机制及其相互作用如图1所示。

4 展望

尽管目前已初步建立以ICE-CBF-COR为核心的信号通路框架，并明确了其与多种激素信号的互作关系，但该领域仍面临若干关键科学问题亟待解决，这些瓶颈制约着抗寒分子机制的深度解析与实际育种应用转化。

（1）多组学整合分析不足，系统验证机制缺乏。转录组数据表明，橡胶树抗寒相关基因显著富集于蛋白激酶、苯丙烷/类黄酮生物合成、激素信号及代谢等通路[8, 16-17]，但基因组、转录组、蛋白组与代谢组之间的系统性关联网络仍未建立，“基因–代谢物–表型”的完整调控链条尚未清晰。值得注意的是，与拟南芥等模式植物相比，热带作物木麻黄中部分*COR*基因被证实存在结构缺失现象[57]，这提示橡胶树可能存在类似情况，尽管部分抗氧化及冷响应基因在体外实验中表现出明确的功能活性[58]，但其上游调控因子识别、所属通路定位及与其他通路的交叉互作机制仍不明确。

（2）缺乏高效的本体遗传转化体系。当前橡胶树抗寒相关基因功能验证存在显著瓶颈，除*ICE*和*CBF*等少数已获功能验证的基因外，绝大多数候选基因仍停留在拟南芥等模式植物的异源表达验证阶段。尽管遗传转化系统在橡胶树原生质体与愈伤组织基因编辑中已取得初步进展[59-60]，但编辑效率、稳定性及适用范围仍有局限。加之橡胶树种质遗传背景复杂，且掌握成熟橡胶树遗传转化技术的机构有限，进一步加剧了功能基因验证的难度。因此，需构建适用于橡胶树自身遗传背景的稳定遗传转化



椭圆形代表调节蛋白，→ 代表促进，┤ 代表抑制

Ellipses indicate regulatory proteins, "→" indicates promotion, "┤" indicates inhibition

图1　橡胶树转录因子对低温胁迫的响应

Fig. 1　Response of rubber tree transcription factors to cold stress

与基因编辑平台，为精准解析抗寒分子机制、培育高适应性橡胶树新品种提供不可替代的技术支撑。

（3）表观遗传调控机制的系统性解析仍待突破。作为植物低温应答的关键调控层级，表观遗传修饰在橡胶树中的研究多局限于*ICE*和*CBF*基因的DNA甲基化与组蛋白修饰动态，而对非编码RNA（如miRNA、长链非编码RNA）的调控潜力探索不足。例如，拟南芥中已发现某些miRNA可通过靶向调控*CBF*及*COR*基因调控抗寒性表型[61]；长链非编码RNA则能通过反义转录本调节*CBF1*表达[62]；藜麦中亦有研究报道低温诱导的长链非编码RNA选择性剪接事件[63]。这些在其他物种中验证的表观调控机制在橡胶树中是否保守，以及它们如何与现有通路协同构建抗寒网络，仍需结合多组学技术与基因编辑手段进行系统性验证与机制解析。

（4）构建分子设计育种体系。随着多个橡胶树品种的基因组草图[64]、端粒到端粒基因组[65]及泛基因组[66]的相继发表，该物种的基因组资源日趋丰富，分子标记的开发已不再是制约橡胶树遗传改良的关键因子[67-68]。然而，由于抗寒表型评价的复杂性，现有分子标记与抗寒性状之间尚未建立起可靠的遗传关联，其在育种实践中的应用价值也未能在功能层面得到系统验证。未来需着力构建橡胶树抗寒种质的表观基因组与全基因组变异数据库，开发与抗寒性状紧密连锁的功能标记，并融合基因编辑等现代生物技术，推动育种模式从传统经验筛选向精准分子设计转型。

综上，通过多学科交叉与技术融合，系统阐明橡胶树抗寒的分子调控网络，不仅可为培育高抗寒新种质提供理论依据，也将为全球天然橡胶产业的稳定发展提供关键技术支撑，从而推动该领域从基础研究到产业应用的实质性跨越。

参考文献

[1] 刘金河. 巴西橡胶树的水分状况与生长和产胶量的关系 [J]. 生态学报, 1982, 2(3): 217-224.
Liu JH. Relationship between water status and growth and rubber yield of *Hevea brasiliensis* [J]. Acta Ecol Sin, 1982, 2(3): 217-224.

[2] 佟金鹤, 张卫红, 刘少军, 等. 中国橡胶树大风、寒害的时空分

布分析 [J]. 生态科学, 2023, 42(2): 43-48.
Tong JH, Zhang WH, Liu SJ, et al. Temporal and spatial distribution analysis of gale damage and chilling injure of *Hevea Brasiliensis* in China [J]. Ecol Sci, 2023, 42(2): 43-48.

[3] 安锋, 王立丰, 王纪坤, 等. 海南西部2015/2016年度橡胶树寒害情况及处理建议 [J]. 中国热带农业, 2016(6): 28-32, 39.
An F, Wang LF, Wang JK, et al. Cold damage of rubber trees in western Hainan in 2015/2016 and its treatment suggestions [J]. China Trop Agric, 2016(6): 28-32, 39.

[4] 王立丰, 吴绍华, 田维敏. 巴西橡胶树抗寒机制研究进展 [J]. 热带作物学报, 2012, 33(7): 1320-1325.
Wang LF, Wu SH, Tian WM. Advances on the mechanism for chilling tolerance of rubber tree *Hevea brasiliensis* muell. arg [J]. Chin J Trop Crops, 2012, 33(7): 1320-1325.

[5] Xu Y, Hu W, Song S, et al. MaDREB1F confers cold and drought stress resistance through common regulation of hormone synthesis and protectant metabolite contents in banana [J]. Hortic Res, 2023, 10(2): uhac275.

[6] Guo WL, Sun YQ, Chai JQ, et al. MsAREB1 enhances combined cold and saline-alkali stress tolerance by promoting ascorbic acid biosynthesis in alfalfa [J]. Plant Biotechnol J, 2025, 23(8): 3349-3362.

[7] Si J, Fan ZQ, Wu CJ, et al. MaHsf24, a novel negative modulator, regulates cold tolerance in banana fruits by repressing the expression of HSPs and antioxidant enzyme genes [J]. Plant Biotechnol J, 2024, 22(10): 2873-2886.

[8] Gong XX, Yan BY, Hu J, et al. Transcriptome profiling of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) discovers candidate regulators of the cold stress response [J]. Genes Genom, 2018, 40(11): 1181-1197.

[9] 杨汉金, 林梅馨. 巴西橡胶树生物膜的冷害 [J]. 福建热作科技, 1991, 16(2): 1-5.
Yang HJ, Lin MX. The chilling injury of biomembrances in *Hevea brasiliensis* [J]. Fujian Sci Technol Trop Crops, 1991, 16(2): 1-5.

[10] Kamal MM, Ishikawa S, Takahashi F, et al. Large-scale phosphoproteomic study of *Arabidopsis* membrane proteins reveals early signaling events in response to cold [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(22): 8631.

[11] Zhao CZ, Wang PC, Si T, et al. MAP kinase cascades regulate the cold response by modulating ICE1 protein stability [J]. Dev Cell, 2017, 43(5): 618-629.e5.

[12] Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, et al. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. Genes Dev, 2003, 17(8): 1043-1054.

[13] Cheng H, Cai HB, Fu HT, et al. Functional characterization of *Hevea brasiliensis* CRT/DRE binding factor 1 gene revealed regulation potential in the CBF pathway of tropical perennial tree [J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0137634.

[14] Chinnusamy V, Zhu JH, Zhu JK. Cold stress regulation of gene expression in plants [J]. Trends Plant Sci, 2007, 12(10): 444-451.

[15] Weeramange MV, Gu CR, Xin SC, et al. Transcriptomic analysis of differential gene expression in *Hevea brasiliensis* under short-term cold stress [J]. Plants, 2025, 14(18): 2900.

[16] Cheng H, Chen X, Fang JL, et al. Comparative transcriptome analysis reveals an early gene expression profile that contributes to cold resistance in *Hevea brasiliensis* (the Para rubber tree) [J]. Tree Physiol, 2018, 38(9): 1409-1423.

[17] Mao CL, Li L, Yang T, et al. Transcriptomics integrated with widely targeted metabolomics reveals the cold resistance mechanism in *Hevea brasiliensis* [J]. Front Plant Sci, 2023, 13: 1092411.

[18] Yuan HM, Sheng Y, Chen WJ, et al. Overexpression of *Hevea brasiliensis* HbICE1 enhances cold tolerance in *Arabidopsis* [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 1462.

[19] 李言. 橡胶树低温胁迫抗性相关激素信号途径解析 [D]. 海口: 海南大学, 2021.
Li Y. Dissection of hormone signaling pathway in the regulation of cold stress resistance in rubber tree (*Hevea brasiliensis* muell.arg) [D]. Haikou: Hainan University, 2021.

[20] Jofuku KD, den Boer BG, Van Montagu M, et al. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2* [J]. Plant Cell, 1994, 6(9): 1211-1225.

[21] Okamuro JK, Caster B, Villarroel R, et al. The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(13): 7076-7081.

[22] 张永磊, 黄惜, 王洪星. 不同耐寒品种橡胶树*ICE*与*CBF*基因对低温胁迫的表达差异 [J]. 分子植物育种, 2022, 20(23): 7796-7803.
Zhang YL, Huang X, Wang HX. Expression differences of *ICE* and *CBF* genes in different cold-tolerant rubber tree varieties under low temperature stress [J]. Mol Plant Breed, 2022, 20(23): 7796-7803.

[23] Doherty CJ, Van Buskirk HA, Myers SJ, et al. Roles for *Arabidopsis* CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance [J]. Plant Cell, 2009, 21(3): 972-984.

[24] Zeng XW, Jiang WZ, Zhang JL, et al. Ethylene negatively regulates cold tolerance through HbEIN3-HbICE2 regulatory module in *Hevea brasiliensis* [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 219: 109397.

[25] Shi YT, Tian SW, Hou LY, et al. Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of *CBF* and type-A *ARR* genes in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2012, 24(6): 2578-2595.

[26] Agarwal M, Hao YJ, Kapoor A, et al. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of *CBF* genes

and in acquired freezing tolerance [J]. J Biol Chem, 2006, 281(49): 37636-37645.

[27] Wang X, Liu WC, Zeng XW, et al. HbSnRK2.6 functions in ABA-regulated cold stress response by promoting HbICE2 transcriptional activity in *Hevea brasiliensis* [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(23): 12707.

[28] Fowler S, Thomashow MF. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway [W [J]. Plant Cell, 2002, 14(8): 1675-1690.

[29] Ahmad M, Li JZ, Yang QS, et al. Phylogenetic, molecular, and functional characterization of PpyCBF proteins in Asian pears (*Pyrus pyrifolia*) [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2074.

[30] Ding YL, Shi YT, Yang SH. Regulatory networks underlying plant responses and adaptation to cold stress [J]. Annu Rev Genet, 2024, 58: 43-65.

[31] Deng XM, Wang JX, Li Y, et al. Comparative transcriptome analysis reveals phytohormone signalings, heat shock module and ROS scavenger mediate the cold-tolerance of rubber tree [J]. Sci Rep, 2018, 8: 4931.

[32] Ohme-Takagi M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element [J]. Plant Cell, 1995, 7(2): 173-182.

[33] Cheng H, Chen X, Zhu JS, et al. Overexpression of a *Hevea brasiliensis ErbB-3 binding protein 1* gene increases drought tolerance and organ size in *Arabidopsis* [J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 1703.

[34] Duan CF, Argout X, Gébelin V, et al. Identification of the *Hevea brasiliensis* AP2/ERF superfamily by RNA sequencing [J]. BMC Genom, 2013, 14: 30.

[35] Putranto RA, Duan CF, Kuswanhadi, et al. Ethylene response factors are controlled by multiple harvesting stresses in *Hevea brasiliensis* [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0123618.

[36] Lestari R, Rio M, Martin F, et al. Overexpression of *Hevea brasiliensis* ethylene response factor HbERF-IXc5 enhances growth and tolerance to abiotic stress and affects laticifer differentiation [J]. Plant Biotechnol J, 2018, 16(1): 322-336.

[37] 王其同. 橡胶树低温相关ERF转录因子的克隆及功能研究 [D]. 海口: 海南大学, 2012.
Wang QT. Cloning and functional analysis of ERF transeription factor genes related to low temperature in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) [D]. Haikou: Hainan University, 2012.

[38] 文维, 江威增, 袁红梅. 橡胶树HbERF109互作蛋白筛选 [J]. 热带作物学报, 2026, 47(4): 825-836.
Wen W, Jiang WZ, Yuan HM. Screening of interacting proteins for HbERF109 in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) [J]. Chin J Trop Crops, 2026, 47(4): 825-836.

[39] 翟琪麟. 橡胶树 *HbWRKY7* 和 *HbWRKY11* 的克隆及功能研究 [D]. 海口: 海南大学, 2013.
Zhai QL. Cloning and functional analysis of *HbWRKY7* and *HbWRKY11* in *Hevea brasiliensis* [D]. Haikou: Hainan University, 2013.

[40] Kang GJ, Yan D, Chen XL, et al. HbWRKY82, a novel IIc WRKY transcription factor from *Hevea brasiliensis* associated with abiotic stress tolerance and leaf senescence in *Arabidopsis* [J]. Physiol Plant, 2021, 171(1): 151-160.

[41] 余文才, 李言, 吴绍华, 等. 巴西橡胶树HbHsfA4a的克隆及其对低温胁迫的响应 [J]. 热带作物学报, 2019, 40(5): 898-904.
Yu WC, Li Y, Wu SH, et al. Cloning of HbHsfA4a and its transcriptional responses to cold stress in *Hevea brasiliensis* [J]. Chin J Trop Crops, 2019, 40(5): 898-904.

[42] 李言, 余文才, 陆庆志, 等. 非生物胁迫对橡胶树热激转录因子家族成员表达的影响 [J]. 热带作物学报, 2021, 42(8): 2119-2125.
Li Y, Yu WC, Lu QZ, et al. Effects of abiotic stresses on the expression of heat shock transcrip-tion factor (HSF) family members in rubber tree (*Hevea brasilien-sis* Muell. Arg.) [J]. Chin J Trop Crops, 2021, 42(8): 2119-2125.

[43] Yang BS, Zhang C, Yang JJ, et al. Genome-wide investigation of NAC transcription factors and their response to cold stress in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) [J]. J Plant Growth Regul, 2024, 43 (11): 4085-4098.

[44] Abdullah SNA, Azzeme AM, Yousefi K. Fine-tuning cold stress response through regulated cellular abundance and mechanistic actions of transcription factors [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 850216.

[45] Wang Y, Mostafa S, Zeng W, et al. Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16): 8568.

[46] 刘云飞, 李言, 田维敏. 橡胶树蛋白激酶基因 *SnRK2.7* 的克隆及表达 [J]. 热带生物学报, 2024, 15(1): 1-9.
Liu YF, Li Y, Tian WM. Cloning and expression analysis of sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 2.7(*SnRK2.7*) gene in *Hevea brasiliensis* [J]. J Trop Biol, 2024, 15(1): 1-9.

[47] Zhang ZL, Zhu JH, Zhang QQ, et al. Molecular characterization of an ethephon-induced Hsp70 involved in high and low-temperature responses in *Hevea brasiliensis* [J]. Plant Physiol Biochem, 2009, 47(10): 954-959.

[48] Chen WJ, Wang X, Yan S, et al. The ICE-like transcription factor HbICE2 is involved in jasmonate-regulated cold tolerance in the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) [J]. Plant Cell Rep, 2019, 38(6): 699-714.

[49] Qiu YM, Guo J, Jiang WZ, et al. HbBIN2 functions in plant cold stress resistance through modulation of HbICE1 transcriptional activity and ROS homeostasis in *Hevea brasiliensis* [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(21): 15778.

[50] Campos Mantello C, Boatwright L, da Silva CC, et al. Deep expression analysis reveals distinct cold-response strategies in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) [J]. BMC Genom, 2019, 20: 455.

[51] Casali C, Galgano L, Zannino L, et al. Impact of heat and cold shock on epigenetics and chromatin structure [J]. Eur J Cell Biol, 2024, 103(1): 151373.

[52] 冉莉萍, 孔月琴, 方婷婷, 等. 逆境胁迫下植物表观遗传机制的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2014, 30(8): 8-15.
Ran LP, Kong YQ, Fang TT, et al. Research progresses of stress-induced epigenetic regulation mechanism in plant [J]. Biotechnol Bull, 2014, 30(8): 8-15.

[53] Uthup TK, Ravindran M, Bini K, et al. Divergent DNA methylation patterns associated with abiotic stress in *Hevea brasiliensis* [J]. Mol Plant, 2011, 4(6): 996-1013.

[54] Tang X, Wang QC, Yuan HM, et al. Chilling-induced DNA Demethylation is associated with the cold tolerance of *Hevea brasiliensis* [J]. BMC Plant Biol, 2018, 18: 70.

[55] 张永磊. 巴西橡胶树冷胁迫应答相关基因的组蛋白修饰研究 [D]. 海口: 海南大学, 2022.
Zhang YL. Histone modification of cold responsive genes in *Hevea brasiliensis* [D]. Haikou: Hainan University, 2022.

[56] Ye KY, Li H, Ding YL, et al. BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE2 negatively regulates the stability of transcription factor ICE1 in response to cold stress in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2019: tpc.00058.2019.

[57] Ren HM, Zhong Y, Guo LY, et al. Molecular mechanisms of low-temperature sensitivity in tropical/subtropical plants: a case study of *Casuarina equisetifolia* [J]. For Res, 2023, 3: 20.

[58] 吴双, 逯锐琳, 冯成天, 等. 橡胶树*HbTRXh5*基因在酵母中的表达及抗逆性分析 [J]. 生物技术通报, 2024, 40(12): 136-144.
Wu S, Lu RL, Feng CT, et al. Expression of *HbTRXh5* gene of *Hevea brasiliensis* in yeast and analysis on its resistance to stress [J]. Biotechnol Bull, 2024, 40(12): 136-144.

[59] Fan YT, Xin SC, Dai XM, et al. Efficient genome editing of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) protoplasts using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins [J]. Ind Crops Prod, 2020, 146: 112146.

[60] Dai XM, Yang XF, Wang C, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Hevea brasiliensis* [J]. Ind Crops Prod, 2021, 164: 113418.

[61] Megha S, Basu U, Kav NNV. Regulation of low temperature stress in plants by microRNAs [J]. Plant Cell Environ, 2018, 41(1): 1-15.

[62] Kindgren P, Ard R, Ivanov M, et al. Transcriptional read-through of the long non-coding RNA *SVALKA* governs plant cold acclimation [J]. Nat Commun, 2018, 9: 4561.

[63] Zheng L, Zhao YW, Gan YF, et al. Full-length transcriptome sequencing reveals the impact of cold stress on alternative splicing in quinoa [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(10): 5724.

[64] 钱萧然, 张靖, 牛迎凤, 等. 橡胶树基因组测序及组装研究进展 [J]. 热带农业科技, 2025, 48(3): 93-100.
Qian XR, Zhang J, Niu YF, et al. Research progress on genome sequencing and assembly of rubber tree [J]. Trop Agric Sci Technol, 2025, 48(3): 93-100.

[65] Li CC, Yuan Y, Nie ZY, et al. The haplotype-resolved telomere-to-telomere genome and OMICS analyses reveal genetic responses to tapping in rubber tree [J]. Nat Commun, 2025, 16: 6255.

[66] Fang YJ, Xiao XH, Lin JS, et al. Pan-genome and phylogenomic analyses highlight *Hevea* species delineation and rubber trait evolution [J]. Nat Commun, 2024, 15: 7232.

[67] Silva CC, Mantello CC, Campos T, et al. Leaf-, panel- and latex-expressed sequenced tags from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) under cold-stressed and suboptimal growing conditions: the development of gene-targeted functional markers for stress response [J]. Mol Breeding, 2014, 34(3): 1035-1053.

[68] Tian MJ, Li WX, Luo P, et al. Genetic diversity analysis and core germplasm bank construction in cold resistant germplasm of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) [J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 14533.

（责任编辑　张婷婷）

生物技术通报
·综述与专论· BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):45-57

AA9家族裂解性多糖单加氧酶的研究进展

李聪[1,2] 于濡沄[2] 郑菲[2*] 郭玉杰[1*]

（1.中国农业科学院农产品加工研究所 农业农村部农产品加工综合性重点实验室,北京 100193；2.北京林业大学生物科学与技术学院，北京 100083）

摘 要： 裂解性多糖单加氧酶（lytic polysaccharide monooxygenase, LPMO）能通过氧化裂解的方式断裂纤维素等多糖链的糖苷键，与糖苷水解酶协同降解木质纤维素时，可以显著提升产糖效率，在木质纤维素生物质转化中具有重要作用。其中，真菌来源的AA9家族LPMO凭借其优异的氧化活性和广泛的底物谱，在食品、能源及材料等领域展现出广阔的应用前景。本文系统综述了AA9家族LPMO的来源及功能的多样性，指出不同来源的LPMO对糖苷水解酶的协同促进效果、底物降解类型存在显著差异；对其结构进行深入分析发现，催化结构域表面的Loop区对底物的识别、结合以及氧化区域的选择起着核心调控作用；除此之外，在双结构域的LPMO中，CBM结构域也会对LPMO结合底物的过程产生重要影响。同时，本文还对MALDI-TOF-MS、HPAEC-PAD及基于显色反应等多种酶活测定方法的原理与适用范围进行分析比较，发现色谱–质谱联用策略是目前定量分析LPMO氧化产物的最主要的方法之一。最后，本文详细总结了LPMO在食品加工、生物能源及纳米纤维素制备等领域展现出的应用潜力。因此，通过LPMO酶资源的挖掘或酶分子改良获得更多适合工业生产应用的新型酶制剂是目前研究工作的重要方向。深入剖析了当前AA9家族LPMO研究在酶资源功能表征、底物特异性分子机制解析以及实际应用效率提升等方面存在的关键技术问题，并针对性地提出了结合宏基因组学挖掘新酶、融合结构预测与机器学习解析底物选择性、针对不同预处理工艺开展酶分子定向改造等未来研究方向与策略建议。

关键词： 裂解性多糖单加氧酶；AA9家族；功能调控机制；氧化区域选择性；协同催化；活性测定；工业应用

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1444

Research Progress of AA9 Family Lytic Polysaccharide Monooxygenases

LI Cong[1,2] YU Ru-yun[2] ZHENG Fei[2*] GUO Yu-jie[1*]

（1. *Comprehensive Key Laboratory of Agro-products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing* 100193; 2. *College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing* 100083）

Abstract: Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) can cleave glycosidic bonds in polysaccharide chains such as cellulose through oxidative cleavage. When acting synergistically with glycoside hydrolases in lignocellulose degradation, LPMOs significantly enhance sugar release efficiency, playing a crucial role in lignocellulosic biomass conversion. Among them, fungal LPMOs from the AA9 family exhibit broad substrate spectra and excellent oxidative activity, demonstrating great application potential in the food, energy, and materials industries. This review systematically summarizes the diversity of sources and functions of AA9 family LPMOs, highlighting that LPMOs from different origins exhibit marked differences in their promoting effects on glycoside hydrolases and substrate degradation patterns. In-depth structural analysis reveals that the Loop regions on the surface of the catalytic domain play a central regulatory role in substrate recognition, binding, and regioselectivity of oxidation. Additionally, in multi-domain LPMOs, the carbohydrate-binding module (CBM) significantly influences the process of substrate binding. Furthermore, this review compares the principles and applicability of various activity measurement methods, including MALDI-TOF-MS, HPAEC-PAD, and

收稿日期：2025-12-28

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（32402805），国家农业科技创新工程项目（CAAS-ASTIP-2026）

*通信作者：郑菲 zhengfei0718@bjfu.edu.cn，郭玉杰 guoyujie@caas.cn

colorimetric assays, indicating that combined chromatography-mass spectrometry strategies are among the most widely used approaches for the quantitative analysis of LPMO oxidation products. Finally, the considerable application potential of LPMOs in food processing, bioenergy, and nanocellulose preparation is discussed in detail. Therefore, the discovery of novel LPMO enzymes or the molecular engineering of existing ones to obtain new enzyme preparations more suitable for industrial applications is an important direction for current research. Moreover, this review deeply analyzes the key technical challenges in current AA9 family LPMO research, including functional characterization of enzyme resources, elucidation of the molecular mechanisms underlying substrate specificity, and improvement of practical application efficiency. Targeted future research directions and strategic suggestions are proposed, such as mining novel enzymes using metagenomics, integrating structural prediction and machine learning to analyze substrate selectivity, and performing targeted enzyme molecular engineering tailored to different pretreatment processes. This review aims to provide a theoretical reference for the development, application, and molecular engineering of AA9 family LPMOs.

Keywords: lytic polysaccharide monooxygenase; AA9 family; functional regulation mechanism; oxidative regioselectivity; synergistic catalysis; activity assay; industrial application

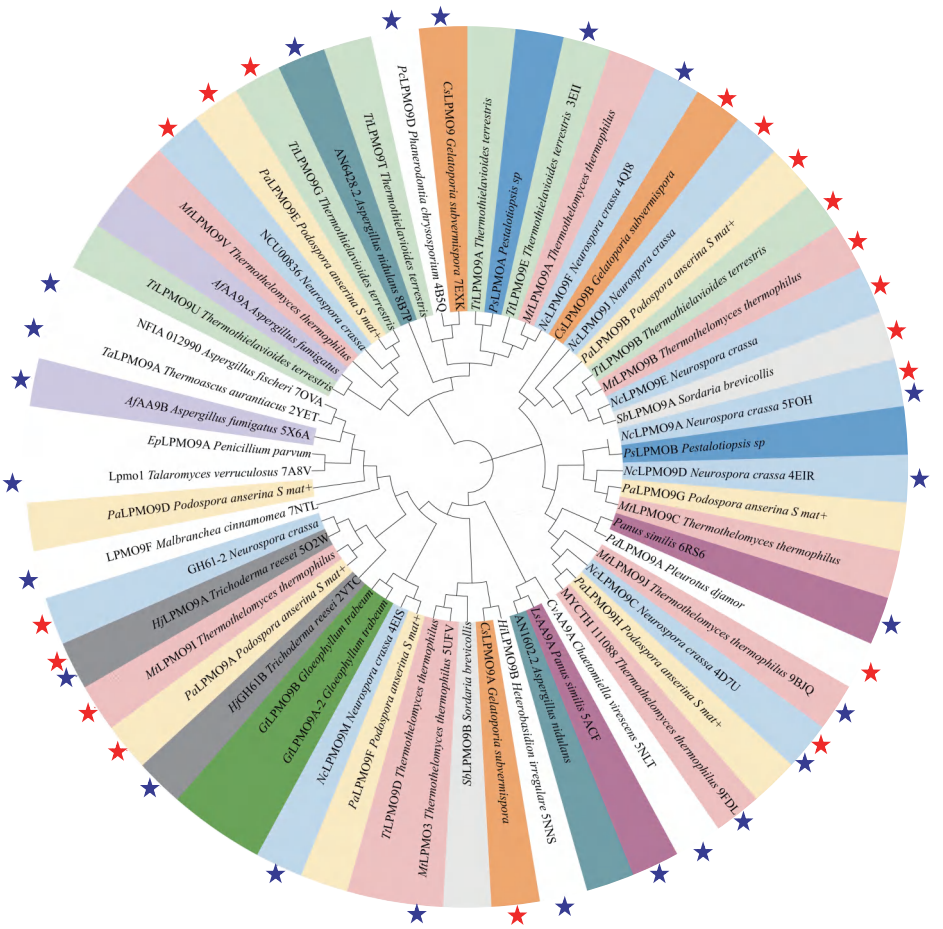
木质纤维素是一种天然生物质资源，其多糖组分与木质素相互交联，构成植物细胞壁的致密骨架结构。然而，这种复杂结构也严重制约了木质纤维素的降解效率[1-2]。近年来，裂解性多糖单加氧酶（lytic polysaccharide monooxygenase, LPMO）因其能通过氧化裂解的方式显著提升木质纤维素的转化效率而受到广泛关注[3-7]。因此，挖掘新型高效的LPMO酶资源，并阐明其结构与功能的关系，对于提升木质纤维素的糖化效率及植物原料中营养物质的释放效率具有重要意义。

LPMO属于铜离子依赖型氧化裂解酶，通过氧化反应断裂糖苷键，破坏纤维素的结晶区域，为糖苷水解酶创造出更多的结合位点，从而提升木质纤维素的降解效率[8-10]。根据碳水化合物活性酶（carbohydrate-active enzymes database, CAZy）数据库分类，LPMO属于辅助活性（auxiliary activities, AA）酶系，目前已鉴定出AA9-AA11、AA13-AA17共8个家族[11-13]。其中，真菌来源的AA9家族LPMO凭借其高效的纤维素氧化裂解活性、广泛的底物谱以及显著的协同增效作用，已成为工业应用前景较为广阔的家族之一[6, 14]。

近年来，针对AA9家族LPMO的研究已从前期的资源挖掘阶段，逐步深化至对其催化机制、功能开发以及协同效果优化的系统性探索。随着分子动力学模拟、AI结构预测等技术的应用，其结构与功能的内在关联也得到了更深入地阐明。因此，系统梳理AA9家族LPMO的研究进展，包括LPMO的来源、作用机制、结构与功能之间的关系、活性测定方法等，不仅可以为相关领域的基础研究提供理论参考，同时对于推动该家族酶的分子改良以及工业应用具有重要的意义。

1 AA9家族LPMO的来源及功能多样性

目前，GenBank数据库中收录的AA9家族LPMO的基因编码序列已超过1 500条，但完成功能表征的成员约57个，且全部来源于真菌（图1）。其中，包含了能高效降解木质纤维素的子囊菌与担子菌，如嗜热毁丝菌（*Thermothelomyces thermophilus*）、太瑞斯梭孢壳霉（*Thermothielavioides terrestris*）、粗糙脉孢菌（*Neurospora crassa*）、鹅柄孢壳菌（*Podospora anserina*）、密粘褶菌（*Gloeophyllum trabeum*）及异担子菌（*Heterobasidion irregulare*）等。这些真菌基因组中虽然普遍编码了数量较多的AA9家族LPMO基因序列，但是，仅有部分序列成功进行了异源表达和功能表征。根据文献报道，这些已进行功能鉴定的AA9家族LPMO的共同特征是均对纤维素类底物展现出或高或低的氧化活性，并且能够与纤维素酶、木聚糖酶等糖苷水解酶表现出良好的协同增效作用。实际上，越来越多的研究显示，纤维素并非AA9家族LPMO的首选底物，部分LPMO已经进化出了木聚糖的氧化裂解活性。例如，来源于*Malbranchea cinnamomea*的*Mc*LPMO9H[14]和来源于*T. thermophilus*的*Mt*LPMO9A[15]是最早报道的能对木聚糖进行氧化裂解的LPMO9，这两种酶均为单模块酶，且主要为C1氧化酶，序列同源性达55.6%。研究表明，LPMO对木聚糖的这种氧化活性往往依赖于纤维素的存在，换句话说，LPMO9很难独立作用于游离的木聚糖，这主要是由于木聚糖的侧链往往会产生空



红色五角星为含CBM1的成员；蓝色五角星为已解析晶体结构的成员；扇形颜色代表不同物种来源，相同颜色代表该物种包含多条序列，未着色区域为仅含单条序列的物种

Red pentagrams represent members containing the CBM1 domain. Blue pentagrams indicate members with resolved crystal structures. Fan segment colors distinguish species sources, with the same color indicating one species with multiple sequences, and uncolored segments representing species with only a single sequence

图1　AA9家族代表性LPMO的系统进化树分析

Fig. 1　Phylogenetic tree analysis of representative AA9 LPMO

间位阻，影响其与LPMO的结合。而去除侧链的木聚糖吸附到纤维素表面形成的纤维素-木聚糖共聚物结构，更易于被LPMO9识别，因此在混合体系中LPMO9更容易表现出木聚糖的氧化裂解活性，这一结论在*Tt*LPMO9E和*Nc*LPMO9F的研究中也得到了证实。研究显示，*T. terrestris*来源的*Tt*LPMO9E在磷酸溶胀纤维素（PASC）和木聚糖的山毛榉木葡糖醛木聚糖混合物反应体系中，其产物类型并非以纤维素来源的产物为主，表明与纤维素结合的木聚糖成为该酶的优势底物[16]。在*N. crassa*已深入研究的9个AA9成员中，对LPMO9s与PASC和山毛榉木葡糖醛酸木聚糖混合物反应中产生的氧化型纤维素和木聚糖衍生产物进行定量分析发现，木聚糖活性最强的LPMO——*Nc*LPMO9F，其氧化型木聚糖衍生产物与氧化型纤维素衍生产物的比例为3∶1。而同源的*Nc*LPMO9L则以纤维素衍生产物为主。显然降解木聚糖可以是某些LPMO9s的主要活性，但这种活性因酶的不同而存在差异，并且木聚糖的类型及其与纤维素的相互作用也会对此产生影响[17]。另外，值得注意的是，尽管部分LPMO9会在纤维素存在的情况下增强对木聚糖的氧化活性，但也有报道显示，LPMO9对纯的葡甘露聚糖和木葡聚糖发挥作用[14, 18–20]。这种对纤维素依赖性的差异很可能与溶液中半纤维素的刚性和构象状态有关，也可能与

LPMO9对这些底物的亲和力差异相关，其中具体的分子机制还需要通过对LPMO与底物复合物构象的变化做进一步深入探究。表1对不同来源的AA9家族LPMO及其功能进行了总结。

表1 不同来源的AA9家族LPMO及其功能

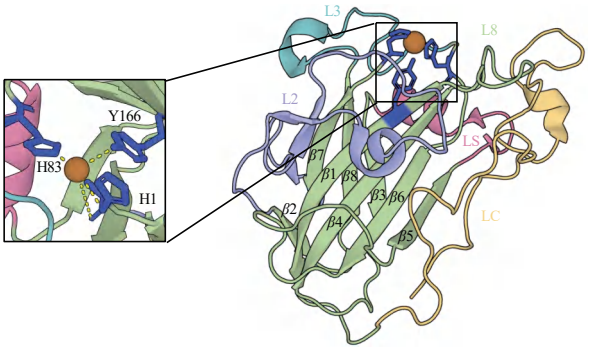
Table 1 AA9 family LPMO from different sources and their functions

名称 Name	来源 Source	功能 Function	参考文献 Reference
*Af*AA9B	*Aspergillus fumigatus*	与纤维素酶协同作用，使汽爆甘蔗渣的糖化效率提升20%	[21]
*Ms*LPMO2	*Morchella sextelata*	与纤维素酶联用，使稻草和小麦秸秆的还原糖产量分别提升126.4%和133.5%	[7]
*Mt*LPMO9A	*Thermothelomyces thermophilus*	突变体与木聚糖酶协同作用，使木聚糖的还原糖产量提高57%	[22]
*Mt*LPMO9G	*Thermothelomyces thermophilus*	与纤维素酶联用，使玉米秸秆的还原糖产量提升242%	[23]
*Mt*LPMO9V	*Thermothelomyces thermophilus*	与内切葡聚糖酶协同作用，对微晶纤维素的协同效率可达120%	[24]
*Nc*LPMO9C	*Neurospora crassa*	与纤维二糖水解酶联用，使高结晶纤维素的还原糖产量提升169%	[25]
*Pa*LPMO9B	*Podospora anserina*	与纤维素酶协同，使酸和碱预处理甘蔗渣的还原糖产量分别提升了30%和20%	[26]
*Pa*LPMO9H	*Podospora anserina*	与纤维二糖水解酶协同，使PASC的还原糖产量提升60%	[27]
*Pch*AA9C	*Phanerochaete chrysosporium*	与纤维素酶联用，使玉米秸秆的还原糖产量提升1.34倍	[12]
*Pch*AA9F	*Phanerochaete chrysosporium*	与纤维素酶联用，使玉米秸秆的还原糖产量提升1.33倍	[12]
*Pd*LPMO9A	*Pleurotus djamor*	与纤维素酶共同作用，使玉米秸秆还原糖产量提高63.5%	[28]
*Sb*LPMO9A	*Sordaria brevicollis*	与商业纤维素酶协同，使去木质素小麦秸秆的总还原糖产量提升65%	[29]
*Sb*LPMO9B	*Sordaria brevicollis*	与商业纤维素酶协同，使无定形纤维素的总还原糖产量提升101%	[29]
*Ta*LPMO9A	*Thermoascus aurantiacus*	与纤维素酶协同，使微晶纤维素的还原糖产量提升了1.2倍	[30]
*Tt*LPMO9E	*Thermothielavioides terrestris*	与纤维素酶协同，使微晶纤维素的还原糖产量提升了1.9倍	[30]
*Tt*LPMO9G	*Thermothielavioides terrestris*	与木聚糖酶联用，使木聚糖的释放量增加42%	[31]

综上所述，不同真菌源的AA9家族LPMO在编码基因数量与功能催化等方面显示出多样性，为LPMO的基础研究及功能开发提供了丰富的酶资源。然而，已表征成员仅占基因序列总数的不足4%，大量潜在高效酶未被发掘。因此，未来需加强新型、多功能的LPMO的挖掘与表征。

2 AA9家族LPMO的结构特征及作用机制

根据PDB数据库的收录情况可知，目前已有23个LPMO的晶体结构被成功解析（图1蓝色五角星标注），其核心均为β-三明治折叠结构，由8-10个反平行β-折叠通过多个表面Loop区连接而成。根据空间位置和功能的不同，这些Loop区被命名为L2、L3、LS、LC和L8等，它们共同构成了底物结合与催化的核心平台。如图2所示，AA9家族LPMO的活性中心由2个保守组氨酸、1个酪氨酸及1个铜离子组成，其中，铜离子与第1个组氨酸（His1）的侧链咪唑氮、主链氨基氮以及第2个组氨酸的咪唑氮原子配位，形成独特的T形三配位结构[32]，该铜中心的配位状态在催化循环中动态变化，此构型转换是其氧化裂解糖苷键的化学基础，并直接决定了其氧



AA9家族LPMO的结构示意图（PDB ID：4D7U）

Structural schematic diagram of the AA9 family LPMO (PDB ID: 4D7U)

图2 AA9家族LPMO的典型三维结构

Fig. 2 The typical three-dimensional structure of AA9 LPMO

化攻击的位点，产生C1氧化型、C4氧化型，以及C1/C4混合氧化型3种不同的氧化模式[33]。C1氧化型主要是在C1位点发生羟基化生成内酯，进一步转化为醛糖酸；C4氧化型主要是在C4位点发生羟基化生成4-酮醛糖，再通过水合作用生成偕二醇；C1/C4混合氧化型则主要在C1和C4位点产生各种氧化产物，如醛糖酸和4-酮醛糖等[34]。随着研究的不断深

入，非裂解性C6氧化模式也被报道[25]。C6氧化反应会在底物的C6位引入醛基，该醛基会在水中转化为C6偕二醇结构，且不会导致糖苷键断裂，这与传统LPMO催化的糖苷键断裂反应存在差异[35]。研究表明，部分具有C1/C4或C4氧化活性的AA9家族LPMO成员，如来自*T. thermophilus*的*Mt*LPMO9H和*Mt*LPMO9E、来自*N. crassa*的*Nc*LPMO9C和*Nc*LPMO9M，以及来自*H. insolens*的*Hi*LPMO1等，已被证实可生成C4/C6双氧化产物[25, 36]，推测C6氧化反应可能依赖于C4氧化模式的协同作用。综上所述，AA9家族LPMO高度保守的核心结构及其独特的活性中心，共同决定了其多样的催化功能。

3　AA9家族LPMO的功能调控机制

AA9家族LPMO一般分为两种结构类型，一种是整个酶分子仅含有一个催化结构域，另一种是在催化结构域的C端存在一个碳水化合物结合结构域（carbohydrate-binding module, CBM）[27]。其中，催化结构域表面的Loop区在底物识别、结合及氧化区域选择性方面起主导作用，而CBM则通过增强酶与底物界面的相互作用来调节催化效率。

3.1　Loop区及关键残基调节酶的催化

AA9家族LPMO的催化功能主要取决于其催化结构域中的表面Loop区及其关键氨基酸残基，它们对底物的识别、结合以及氧化区域的选择起着核心调控作用。研究表明，这些Loop区（主要包括L2、L3和LC Loop）共同形成一个延伸的底物结合通道，涵盖-3到+2共5个结合位点（图3）[37]。不同Loop区通过调节自身的构象、长度和残基组成，精确调节各结合位点的化学环境，共同塑造出具有高度特异性的底物结合界面。

研究显示，LC Loop主要负责-3位点的识别与锚定，该Loop上相对保守的酪氨酸Tyr残基通过芳香族残基的堆叠作用与底物糖环结合，提供主要的结合力；其附近的谷氨酸Glu、天冬氨酸Asp和精氨酸Arg等残基则通过氢键等相互作用协助稳定结合构象[37]。LC Loop的长度和表面性质显著影响酶对底物物理状态的偏好。例如，研究发现，较长的亲水性LC Loop有利于结合可溶性的纤维寡糖，而较短且富含疏水残基的LC Loop则更容易结合结晶型纤维素[38]。这表明，LC Loop的长度和疏水性是决定

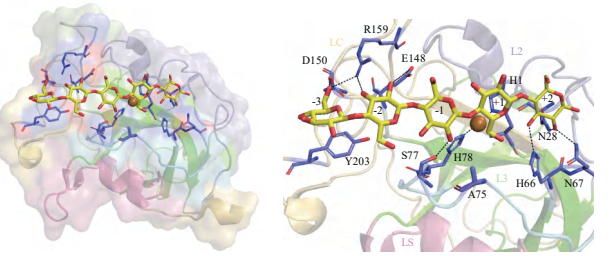
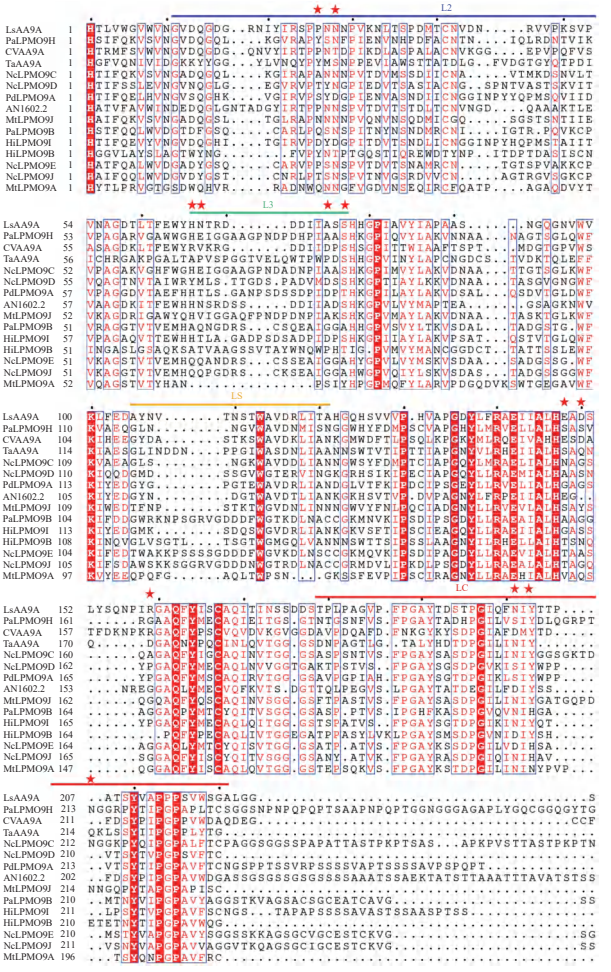


图3　*Ls*AA9A-纤维五糖复合物整体及局部结构图

Fig. 3　Overall and local structural diagrams of the *Ls*AA9A-cellopentaose complex

LPMO底物物理状态偏好的关键因素。此外，这些残基还能通过固定底物链的走向和构象，间接影响C1–H与C4–H键相对于铜活性中心的朝向，从而参与氧化区域选择性的调控。例如，在C1氧化型的*Hi*LPMO9B中，其LC Loop上的Tyr207、Asp205和Glu210与L2 Loop上的Tyr20协同作用，精确控制底物取向，使C1–H键最靠近铜活性中心，从而引导反应向C1氧化进行[39]。这一实例说明，Loop区残基之间的协同作用可通过调控底物结合构象来引导氧化区域选择性。

L2 Loop和L3 Loop在空间上紧密相邻，共同负责-1至+2位点处底物的识别与固定，二者在功能上协同作用。L3 Loop是塑造催化中心化学环境的核心区域，其上的某些氨基酸残基直接参与底物结合与定向，尤其是1个保守的组氨酸（His）残基，常在底物识别和功能调控中扮演关键角色（图4）。例如，在*Ls*AA9A中，L3 Loop上的H66和N67共同与寡糖形成关键氢键，而邻近的A75和S77等疏水性较弱的残基则为线性纤维寡糖链提供了合适的结合空间[37]。这种以His为核心的残基组合模式在*Nc*LPMO9C和*Pa*LPMO9H等能高效作用于纤维寡糖的LPMO中高度保守[40–41]。相反，*Ta*AA9A完全缺乏L3 Loop上的关键His及其他相应残基，因此对纤维寡糖未检测到氧化活性[42]。上述对比表明，L3 Loop上关键His残基的存在及其周围的氨基酸环境，是LPMO识别和氧化可溶性寡糖底物的关键。除了纤维素类底物，该关键His及其所在的序列环境也直接决定了酶对其他复杂多糖的识别能力。例如，*Hi*LPMO9I的L3 Loop上因含有该关键His且周围富含丙氨酸（Ala）和丝氨酸（Ser），因此能特异性识别甘露糖残基；而



蓝线、绿线、黄线和红线分别对应L2、L3、LS和LC Loop区；红色五角星为文中重点讨论的关键功能残基

Blue, green, yellow and red lines correspond to the L2, L3, LS, and LC Loop regions, respectively. Red five-pointed stars indicate key functional residues discussed in the text

图4 AA9家族LPMO催化结构域序列比对

Fig. 4 Sequence alignment of catalytic domains of AA9 family LPMO

*Hi*LPMO9B的L3 Loop则因缺乏上述关键残基，难以有效结合此类可溶性底物[43]。这说明L3 Loop不仅影响纤维素类底物的识别，其残基组成还决定了LPMO对甘露糖等其他多糖的底物特异性。

L2 Loop主要辅助+2位点的底物定向。以*Ls*AA9A为例，该Loop上的N28残基通过与+2位点糖环的O6和O3形成氢键，从而固定底物链末端。这一作用与L3 Loop上H66、N67等残基形成的氢键网络协同，共同确保底物链在催化中心保持正确且稳定的线性构象。N28的氢键作用对*Ls*AA9A的寡糖活性至关重要，该残基缺失或改变常导致酶对可溶性寡糖的活性丧失[38, 44]。例如，*Cv*AA9A和*Ta*AA9A均缺乏对应的天冬酰胺Asn残基，两者也均未表现出对可溶性寡糖的有效活性。此外，L2 Loop通过固定+2位点，间接限制了+1位点糖环的摆动自由度，从而与LC Loop共同调控C1–H与C4–H键相对于铜活性中心的距离和取向，参与氧化选择性的调控。例如，将*Mt*C1LPMO（*Mt*LPMO9A）L2 Loop上的精氨酸（R17）突变为亮氨酸（R17L），可通过改变底物结合模式增强C1氧化选择性[22]。

综上所述，AA9家族LPMO中的L2、L3和LC Loop在底物氧化过程中起到关键作用，并共同参与了底物的结合与催化。这些Loop区的关键氨基酸残基共同塑造了AA9家族LPMO的底物结合平面，在底物特异性结合与氧化区域选择性的精细调控中均发挥着不可或缺的作用。

3.2 CBM1调节酶与底物的结合

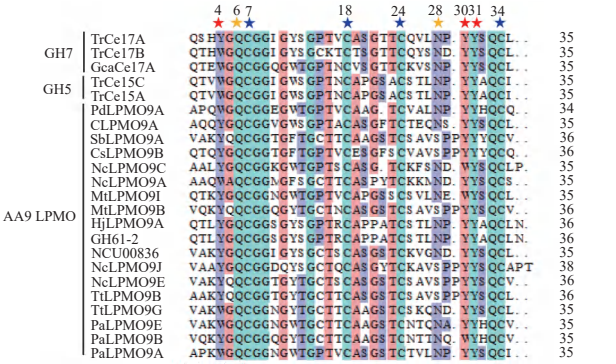
CBM是一类能够特异性识别并结合碳水化合物的蛋白质结构域，其主要功能是将酶的催化结构域锚定在底物表面，从而提升催化效率[27]。在已报道的AA9家族LPMO中，约30%的成员在其C端含有1个CBM1结构域（图1红色五角星标注）。研究表明，来源于*P. anserina*的*Pa*LPMO9H，去除其C端的CBM1会导致*Pa*LPMO9H对PASC的结合能力完全丧失[45]。在催化活性方面，CBM1的作用呈现显著的底物浓度依赖性，即当以低浓度（0.1%）PASC为底物时，缺失CBM1的截短突变体几乎检测不到氧化产物，而当PASC浓度升高至1%时，该截短突变体的产物释放量与全长酶处于同一水平[27]。类似的现象也出现在*S. coelicolor*来源的*Sc*LPMO10C的研究中，其CBM在高底物浓度下对酶活的促进作用同样减弱[46]。这可能是由于高底物浓度下，酶与底物的碰撞频率增加，因此削弱了CBM的靶向优势；同时，CBM固有的高亲和力可能限制酶分子的移动，降低解离速率或引发非生产性结合，从而导致活性降低。进一步研究显示，CBM1结构域也会对*Pa*LPMO9H的氧化区域选择性产生重要影响。野生型的*Pa*LPMO9H主要进行C4氧化，而截去CBM1后则转变为C1氧化[47]。这一现象表明，CBM1可能通过

调节酶与底物结合的构象，影响铜离子与糖环C1/C4位点的相对距离，从而改变氧化区域选择性。然而，CBM1对氧化选择性的上述调控作用并非普遍存在，而是具有酶特异性。例如，在*N. crassa*来源的*Nc*LPMO9C、*H. jecorina*来源的*Hj*LPMO9A中，并未出现相似的研究结论[48–49]。

序列进化关系分析结果显示（图5），LPMO中的CBM与糖苷水解酶中的CBM1具有高度的同源性，两者均存在3个保守的芳香族残基（红色五角星标注）、2个保守的极性氨基酸残基（黄色五角星标注）、4个保守的半胱氨酸残基（蓝色五角星标注）。尽管目前在LPMO中针对这些关键位点功能的研究相对有限，但其在糖苷水解酶中的作用机制已较为明确。以*T. reesei*来源的外切纤维素酶中*Tr*Cel7A的CBM1为例，3个芳香族残基（Y4、Y30和Y31）构成疏水性结合平面，负责识别并结合纤维素表面的糖环，实现初步锚定；2个极性氨基酸残基（Q6和N28）与纤维素链上的羟基形成氢键网络，进一步增强结合稳定性；而由4个半胱氨酸残基（C7、C18、C24和C34）通过二硫键连接形成的“半胱氨酸结”，则对维持该结构域自身的正确折叠与构象完整性起关键作用[50]。在AA9家族LPMO中，通过截断CBM结构域的研究证实，CBM的缺失会降低酶与底物的亲和力[27, 44–45]。分子动力学模拟研究推测*Mt*LPMO9G的CBM1可能采用与糖苷水解酶中的CBM1相似的作用模式[51]。基于序列保守性分析，推测LPMO中CBM1的芳香族残基同样负责疏水结合，极性残基参与氢键网络，半胱氨酸形成的二硫键对维持CBM1结构稳定起关键作用。然而，上述研究结果是基于结构模拟得出的推论，在LPMO实际反应体系中，CBM区关键作用位点的种类及数量、其影响底物结合的分子机制，以及不同氧化类型的LPMO中CBM是否具有相似的影响规律仍需要深入探究。

4　AA9家族LPMO活性测定方法

准确评估AA9家族LPMO的催化活性是其功能与应用研究的基础，目前已发展出5种测定方法。其中，基质辅助激光解吸飞行时间质谱法（matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS）操作简便、灵敏度高，通过直接测定LPMO催化反应产物的质荷比，检测



红色五角星为芳香族残基；黄色五角星为极性氨基酸残基；蓝色五角星为半胱氨酸残基

Red five-pointed stars represent aromatic residues; yellow five-pointed stars represent polar amino acid residues; blue five-pointed stars represent cysteine residues

图5　糖苷水解酶与AA9家族LPMO CBM1序列比对

Fig. 5　Sequence alignment of CBM1 from glycoside hydrolases and AA9 family LPMO

由氧化作用引起的分子量位移，从而定性评估LPMO的活性及其氧化位点[52]。对于需准确定量C1氧化产物的研究，高效阴离子交换色谱–脉冲安培检测法（high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection, HPAEC-PAD）是当前广泛应用的主要方法[53]。该方法利用C1-氧化生成的糖醛酸在碱性条件下带负电荷的特性，使其与阴离子交换柱的亲和力强于中性寡糖，从而实现高效分离，并通过脉冲安培检测器进行高灵敏度检测[54]。其主要局限在于C4氧化产物在碱性条件下不稳定，易发生降解，导致最终分离结果有所损失，从而影响定量分析的准确性[54]。为克服这一局限，HPAEC-PAD常与MALDI-TOF-MS联合使用，通过质谱精确验证氧化产物的分子量，以弥补其在C4产物鉴定和定量上的不足，并确保结果的可靠性[55]。该色谱–质谱联用策略是目前定量分析LPMO氧化产物的主要方法，尤其适用于需要精确区分C1和C4氧化产物的研究。

另外，一些基于显色或荧光反应的间接方法也被广泛应用。例如，3,5-二硝基水杨酸法（3,5-dinitro-2-hydroxybenzoic acid, DNS法）以DNS和还原糖在碱性环境中的氧化–还原反应为基础，通过测定540 nm波长下的吸光值来定量还原糖含量[56]。该方法通过检测还原糖的释放，主要用于评估LPMO

与纤维素酶的协同增效作用，从而间接反映LPMO活性。此外，基于LPMO副反应活性的测定方法也较为常见。2,6-二甲氧基苯酚比色法（2,6-dimethoxyphenol colorimetric method, 2,6-DMP法）基于LPMO的过氧化物酶活性。在过氧化氢存在下，LPMO可催化2,6-DMP氧化生成自由基，随后2个自由基二聚形成在469 nm处有特征吸收的有色产物，通过检测吸光度变化即可定量酶活性。Amplex Red-辣根过氧化物酶检测法（amplex red-horseradish peroxidase hydrogen peroxide detection assay, Amplex Red-HRP法）则基于LPMO的氧化酶活性。在电子供体存在下，未与底物结合的LPMO会发生“解偶联”反应，将氧气还原为过氧化氢。生成的过氧化氢在辣根过氧化物酶催化下，与无荧光的Amplex Red以1∶1的比例反应，生成高荧光的试卤灵，荧光强度与过氧化氢的生成量成正比，从而能够间接定量LPMO的浓度。

综上所述，上述方法各有优劣：质谱法适用于产物定性，色谱法适用于C1产物定量，显色法则适用于高通量筛选。选择何种方法取决于具体研究目标。基于副反应活性的方法操作简便，但其结果不一定反映LPMO对天然底物的真实氧化裂解能力。因此，实际研究中应根据具体目标（如产物鉴定、协同效应评估或高通量筛选）选择或组合上述方法。

5 AA9家族LPMO的应用

AA9家族LPMO能够通过氧化裂解破坏纤维素结晶区，并与多种糖苷水解酶发挥协同作用。目前，该酶已被逐步应用于食品加工、生物能源转化及纳米纤维素绿色制备等领域。以下将从这3个方面对其应用进展进行综述（图6）。

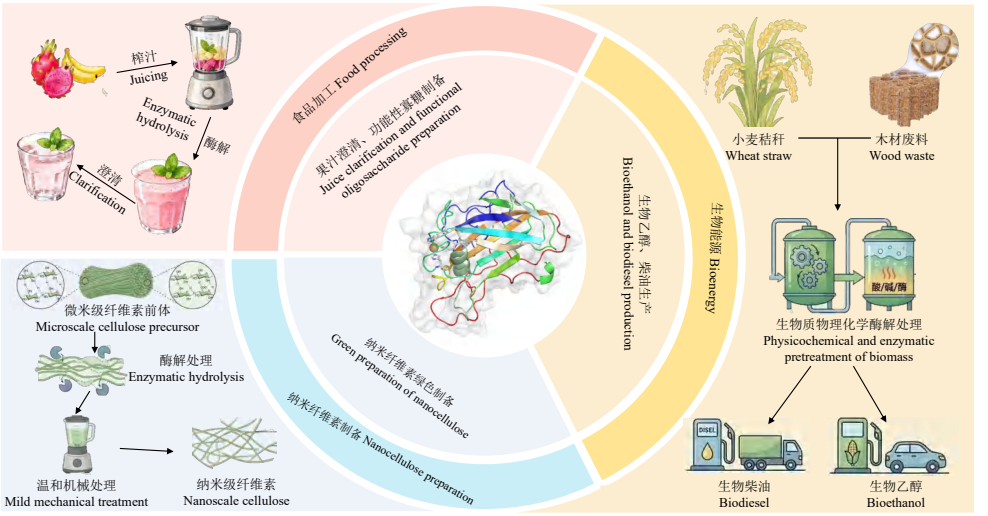


图6 AA9家族LPMO应用示意图

Fig. 6 Schematic diagram of the applications of AA9 family LPMO

5.1 食品加工领域

LPMO可通过氧化方式断裂纤维素结晶区，从而为传统水解酶创造更多的可作用位点，该特性使其成为一种高效的食品加工辅助酶[57-63]。例如，在果汁加工过程中，LPMO可有效降解果胶酶难以处理的纤维素网络，破坏纤维素-果胶复合物的稳定结构，从而提高果汁的澄清度。研究表明，将LPMO与果胶酶复配用于处理苹果汁，可使透光率提升16%，浊度降低21%，果汁澄清度得到明显改善[6]。这表明，LPMO通过破坏纤维素-果胶复合物结构，能够辅助果胶酶提升果汁澄清效果。此外，LPMO与糖苷水解酶的协同作用为研发新的功能性食品配料提供了新路径。两者协同使用可有效分解复杂多糖，生成具有益生元功能的寡糖，这些寡糖不仅有助于改善产品口感，还具备调节肠道菌群的功能[64-65]。综上，LPMO在食品加工中可用于果汁

澄清和功能性寡糖制备。

5.2　生物能源领域

木质纤维素生物质结构较为复杂，其高效降解依赖多种酶的协同配合。在纤维素酶和半纤维素酶中添加AA9家族LPMO可显著提升葡萄糖、木糖等可发酵糖的产量，从而把农业废弃物里的多糖转化为燃料乙醇，实现资源循环利用[66]。研究表明，烟曲霉来源的*Af*AA9B与商业酶制剂Celluclast® 1.5L协同使用，可使蒸汽爆破预处理甘蔗渣的糖化效率提高20%[21]；粗糙脉孢菌来源的*Nc*LPMO9C与纤维二糖水解酶协同使用时，可使微晶纤维素的降解效率提高近40%[25]。上述结果表明，各来源的LPMO均能提升纤维素酶的降解效果，只是增效程度有所不同。AA9家族LPMO除了能够促进纤维素酶之外，与半纤维素酶之间同样展现出明显的协同作用。例如，嗜热毁丝菌来源的LPMO突变体与木聚糖酶协同作用，可使木聚糖降解的还原糖产量提高57%[22]。在降解预处理小麦秸秆时，添加太瑞斯梭孢壳霉来源的*Tt*LPMO9G可使木聚糖和葡萄糖的释放量分别增加42%和35%[31]。综上所述，AA9家族LPMO对纤维素酶和半纤维素酶均有协同增效作用，在生物燃料生产中具有重要应用价值。需要注意的是，LPMO与不同糖苷水解酶的协同效果存在差异，实际应用时需根据底物组成确定不同酶的添加比例。

5.3　纳米纤维素制备领域

传统纳米纤维素制备方法依赖强酸水解或高强度机械处理，存在能耗高、污染重等问题。LPMO因其独特的氧化裂解机制，为绿色、可持续制备纳米纤维素提供了新途径[67-71]。该酶能在温和条件下破坏纤维素的氢键网络、削弱纤维内聚力，同时较好地保持其晶体结构的完整性[27, 72]。不同结构特征的LPMO适用于不同类型的纳米纤维素制备。先前研究表明，不含CBM的AA9家族LPMO在制备纤维素纳米晶时更具优势，所得产物羧基含量更高；而含有CBM的AA9家族LPMO则在促进纳米纤化纤维素的原纤化和提升其胶体稳定性方面表现更佳[73]。这说明CBM1的存在与否直接影响LPMO在纳米纤维素制备中的适用场景。此外，LPMO与糖苷水解酶的协同使用可进一步提升制备效率。将内切葡聚糖酶、木聚糖酶与LPMO复配使用，可有效降低纳米纤化所需的机械能耗，获得组分更均一的纳米纤丝[74]。通过糖苷水解酶与LPMO的协同作用，可从预处理的桦木中分离出无硫酸盐的纳米纤维素，体现了该路径的绿色优势[75-76]。上述应用体现了LPMO在纳米纤维素绿色制备中的潜力，未来可进一步拓展其与其他水解酶（如内切葡聚糖酶、木聚糖酶）的协同体系。

6　总结与展望

AA9家族LPMO作为一类铜离子依赖型氧化酶，能够通过氧化裂解方式破坏纤维素等多糖底物的糖苷键，有效提高纤维素酶的水解效率，在木质纤维素生物转化、食品加工及纳米纤维素制备等领域具有重要应用潜力。本文系统梳理了AA9家族LPMO的来源、结构特征、作用机制、功能调控机制、活性测定方法及应用进展，重点总结了催化结构域表面L2、L3和LC等Loop区在底物识别、结合及氧化区域选择性调控中的作用，以及CBM1结构域在增强底物吸附、调节催化效率等方面的功能。总体而言，AA9家族LPMO的催化性能并非由单一结构决定，而是由铜活性中心、Loop区关键残基、底物结合平面及CBM等多部分共同调控的结果，其功能发挥与酶结构、底物性质及反应条件密切相关。

尽管AA9家族LPMO的研究已取得重要进展，但从基础研究迈向工业应用仍面临三大挑战。

首先，酶资源的挖掘与功能表征严重不足，数据库中已有超过1 500条LPMO基因编码序列，但仅有57个成员完成了功能表征，大量LPMO的功能未知，限制了酶资源库的利用。针对该研究现状，一方面，未来可结合宏基因组学、转录组学和蛋白质组学，从高温、强酸碱或木质纤维素富集环境中定向挖掘候选LPMO，并利用毕赤酵母、丝状真菌等表达体系进行快速验证，构建更为丰富的酶资源库。另一方面，可以在传统的定向进化方法中融入AI策略，采用蛋白质语言模型对已有蛋白进行驯化，结合高通量检测技术，对目标蛋白进行高效的筛选、改造及提升，使酶数据库资源更加丰富。

其次，LPMO底物特异性的分子机制还需要深入解析。目前已报道的AA9家族LPMO，针对其催化中心的关键Loop区及CBM结构域在氧化裂解纤维素过程中的作用机制已有较多探讨，随着研究的不

断深入，一些新型的AA9 LPMO对木聚糖、木葡聚糖等多种非纤维素类物质，以及木质素相关组分也表现出一定活性。这些LPMO识别与催化非纤维素底物的结构基础与分子机制尚没有归纳出统一的规律，缺乏普遍适用的理论模型。因此，未来可结合结构设计和分子动力学模拟等方法，在蛋白质空间结构的指导下开展Loop区定点突变或特定区域缺失的相关研究，有针对性地挖掘影响LPMO的催化效率和底物识别的作用位点，系统解析Loop区对底物作用的分子机制，进一步结合酶学表征，可建立序列特征与底物偏好之间的对应关系，为高性能LPMO酶制剂的设计与开发提供科学依据。

最后，酶在实际应用体系中的性能与协同催化效率有待提升。与纯纤维素底物相比，秸秆、木材等天然木质纤维素底物具有组分复杂和预处理残留物多等特点。经不同方式预处理后，纤维表面理化性质发生明显变化。例如，蒸汽爆破导致的高结晶区暴露可能削弱酶的结合效率；亚硫酸盐预处理残留的木质素及酚类物质易引发酶的氧化失活；稀酸预处理带来的表面负电性增强则会加剧酶与底物间的静电排斥作用等。这些因素共同制约了LPMO在实际降解过程中高效、稳定地发挥协同催化作用。因此，在实际应用方面，可针对不同预处理导致的秸秆理化特性变化，开展酶的定向改造。例如，针对蒸汽爆破导致的高结晶区暴露，可优化L2和L3 Loop区中的关键芳香族及极性残基，从而增强酶与有序纤维素结构的结合与解聚能力；针对亚硫酸盐预处理中的木质素干扰，可构建与纤维二糖脱氢酶的协同电子传递体系，提升酶的催化稳定性；针对稀酸预处理导致的表面负电性增强，则可调整LC Loop区的残基组成，增加正电荷比例，从而增强酶与带电底物的相互作用。

未来通过多学科方法的交叉应用，有望更系统地阐明AA9家族LPMO的作用机制，为其理性设计与性能提升奠定基础，进而推动AA9家族LPMO在食品、饲料、能源等多个领域展现出更广阔的应用前景。

参考文献

[1] Yang Z, Bhagia S, O′Neill H, et al. Deconvoluting structures of component plant biopolymers using deuterium labeled *Brassica oleracea* stems [J]. ACS Sustainable Chem Eng, 2023, 11(49): 17238-17248.

[2] Wang H, Hua Y, Li HP, et al. Comprehensive insights into hydrothermal pretreatment of rice straw from physicochemical structure, organic matter transformation and hydrolysate reuse [J]. Chem Eng J, 2023, 476: 146809.

[3] de Souza TSP, Kawaguti HY. Cellulases, hemicellulases, and pectinases: applications in the food and beverage industry [J]. Food Bioprocess Technol, 2021, 14(8): 1446-1477.

[4] Patel VB, Chatterjee S, Dhoble AS. A review on pectinase properties, application in juice clarification, and membranes as immobilization support [J]. J Food Sci, 2022, 87(8): 3338-3354.

[5] Kumar A, Singh A, Sharma VK, et al. The upsurge of lytic polysaccharide monooxygenases in biomass deconstruction: characteristic functions and sustainable applications [J]. FEBS J, 2024, 291(23): 5081-5101.

[6] 李聪, 牛羽丰, 赵国柱, 等. 裂解性多糖单加氧酶*Tt*LPMO9Y的酶学特性及其在果汁澄清、纤维素降解中的作用 [J]. 食品科学, 2025, 46(17): 101-110.
Li C, Niu YF, Zhao GZ, et al. Enzymatic characterization of lytic polysaccharide monooxygenase *Tt*LPMO9Y and its role in juice clarification and cellulose degradation [J]. Food Sci, 2025, 46(17): 101-110.

[7] Ma L, Zhu CQ, Han Y, et al. Characteristic of a lytic polysaccharide monooxygenase *Ms*LPMO2 from *Morchella sextelata* exhibiting ability to degrade cellulose by oxidation [J]. Chem Eng J, 2025, 503: 158631.

[8] Karnaouri A, Chorozian K, Zouraris D, et al. Lytic polysaccharide monooxygenases as powerful tools in enzymatically assisted preparation of nano-scaled cellulose from lignocellulose: a review [J]. Bioresour Technol, 2022, 345: 126491.

[9] Müller J, Hagen C, Lange S, et al. Copper-dependent lytic polysaccharide monooxygenases: key players for efficient lignocellulose degradation [J]. Biotechnol Bioeng, 2023, 120 (6): 1899-1915.

[10] Chorozian K, Dimarogona M, Ponjavic M, et al. Characterization of an AA9 LPMO from *Fusarium oxysporum* and its role in cellulose hydrolysis and functionalization [J]. Biotechnol Biofuels Bioprod, 2026, 19: 27.

[11] Moon M, Lee JP, Park GW, et al. Lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO)-derived saccharification of lignocellulosic biomass [J]. Bioresour Technol, 2022, 359: 127501.

[12] Xu XF, Chu CE, Li N, et al. Identification and characterization of two AA9 lytic polysaccharide monooxygenases isolated from the enzymatic arsenal in *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Bioresour Bioprocess, 2025, 12: 112.

[13] Hall KR, Elisa Rønnekleiv S, Gautieri A, et al. Structure-function analysis of an understudied type of LPMO with unique redox properties and substrate specificity [J]. ACS Catal, 2025, 15(12): 10601-10617.

[14] Hüttner S, Várnai A, Petrović DM, et al. Specific xylan activity revealed for AA9 lytic polysaccharide monooxygenases of the thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea* by functional

characterization [J]. Appl Environ Microbiol, 2019, 85(23): e01408-e01419.

[15] Frommhagen M, Sforza S, Westphal AH, et al. Discovery of the combined oxidative cleavage of plant xylan and cellulose by a new fungal polysaccharide monooxygenase [J]. Biotechnol Biofuels, 2015, 8: 101.

[16] Tõlgo M, Hegnar OA, Larsbrink J, et al. Enzymatic debranching is a key determinant of the xylan-degrading activity of family AA9 lytic polysaccharide monooxygenases [J]. Biotechnol Biofuels, 2023, 16: 2.

[17] Hegnar OA, Østby H, Petrović DM, et al. Quantifying oxidation of cellulose-associated glucuronoxylan by two lytic polysaccharide monooxygenases from *Neurospora crassa* [J]. Appl Environ Microbiol, 2021, 87(24): e01652-e01621.

[18] Sun PC, de Munnik M, van Berkel WJH, et al. Extending the diversity of *Myceliophthora thermophila* LPMOs: Two different xyloglucan cleavage profiles [J]. Carbohydr Polym, 2022, 288: 119373.

[19] Monclaro AV, Petrović DM, Alves GSC, et al. Characterization of two family AA9 LPMOs from *Aspergillus tamarii* with distinct activities on xyloglucan reveals structural differences linked to cleavage specificity [J]. PLoS One, 2020, 15(7): e0235642.

[20] Østby H, Christensen IA, Hennum K, et al. Functional characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase from *Schizophyllum commune* that degrades non-crystalline substrates [J]. Sci Rep, 2023, 13: 17373.

[21] Velasco J, de Oliveira Arnoldi Pellegrini V, Sepulchro AGV, et al. Comparative analysis of two recombinant LPMOs from *Aspergillus fumigatus* and their effects on sugarcane bagasse saccharification [J]. Enzyme Microb Technol, 2021, 144: 109746.

[22] Guo X, An YJ, Chai CC, et al. Construction of the R17L mutant of *Mt*C1LPMO for improved lignocellulosic biomass conversion by rational point mutation and investigation of the mechanism by molecular dynamics simulations [J]. Bioresour Technol, 2020, 317: 124024.

[23] Qin X, Zou JH, Yang K, et al. Discovering functional diversity of lytic polysaccharide monooxygenases from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* and their application in lignocellulosic biomass degradation [J]. ACS Sustainable Chem Eng, 2023, 11 (29): 10929-10937.

[24] Li WM, Yuan H, Hu Y, et al. Construction of new thermostable *Mt*LPMO9V in synergism with cellulases for efficient lignocellulosic hydrolysis [J]. Bioresour Technol, 2025, 430: 132594.

[25] Sun PC, Laurent CVFP, Boerkamp VJP, et al. Regioselective C4 and C6 double oxidation of cellulose by lytic polysaccharide monooxygenases [J]. ChemSusChem, 2022, 15(2): e202102203.

[26] Long LF, Yang HM, Ren HY, et al. Synergism of recombinant *Podospora anserina Pa*AA9B with cellulases containing AA9s can boost the enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates [J]. ACS Sustainable Chem Eng, 2020, 8(32): 11986-11993.

[27] Forsberg Z, Courtade G. On the impact of carbohydrate-binding modules (CBMs) in lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) [J]. Essays Biochem, 2023, 67(3): 561-574.

[28] Shi Y, Chen K, Long L, et al. Characterization of a new AA9 LPMO from *Pleurotus djamor* and its synergism with cellulase[J]. Int J Biol Macromol, 2023, 242: 124988.

[29] Zhang X, Chen KX, Long LK, et al. Two C1-oxidizing AA9 lytic polysaccharide monooxygenases from *Sordaria brevicollis* differ in thermostability, activity, and synergy with cellulase [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2021, 105(23): 8739-8759.

[30] Kim IJ, Seo N, An HJ, et al. Type-dependent action modes of *Tt*AA9E and *Ta*AA9A acting on cellulose and differently pretreated lignocellulosic substrates [J]. Biotechnol Biofuels, 2017, 10: 46.

[31] Grellier M, Moreau C, Beaugrand J, et al. Action of AA9 lytic polysaccharide monooxygenase enzymes on different cellulose allomorphs [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 275: 133429.

[32] Sagarika MS, Parameswaran C, Senapati A, et al. Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) producing microbes: a novel approach for rapid recycling of agricultural wastes [J]. Sci Total Environ, 2022, 806: 150451.

[33] Monclaro AV, Filho EXF. Fungal lytic polysaccharide monooxygenases from family AA9: Recent developments and application in lignocelullose breakdown [J]. Int J Biol Macromol, 2017, 102: 771-778.

[34] 郭宵, 安亚静, 柴成程, 等. 来源于真菌AA9家族裂解性多糖单加氧酶的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2020, 47(7): 2309-2320.
Guo X, An YJ, Chai CC, et al. Research progress in fungal lytic polysaccharide monooxygenases from AA9 family [J]. Microbiol China, 2020, 47(7): 2309-2320.

[35] Long LF, Hu Y, Sun FB, et al. Advances in lytic polysaccharide monooxygenases with the cellulose-degrading auxiliary activity family 9 to facilitate cellulose degradation for biorefinery [J]. Int J Biol Macromol, 2022, 219: 68-83.

[36] Chen JY, Guo XN, Zhu M, et al. Polysaccharide monooxygenase-catalyzed oxidation of cellulose to glucuronic acid-containing cello-oligosaccharides [J]. Biotechnol Biofuels, 2019, 12: 42.

[37] Tandrup T, Tryfona T, Frandsen KEH, et al. Oligosaccharide binding and thermostability of two related AA9 lytic polysaccharide monooxygenases [J]. Biochemistry, 2020, 59(36): 3347-3358.

[38] Frandsen KEH, Simmons TJ, Dupree P, et al. The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases [J]. Nat Chem Biol, 2016, 12(4): 298-303.

[39] Liu B, Kognole AA, Wu M, et al. Structural and molecular dynamics studies of a C1-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase from *Heterobasidion irregulare* reveal amino acids important for substrate recognition [J]. FEBS J, 2018, 285(12): 2225-2242.

[40] Isaksen T, Westereng B, Aachmann FL, et al. A C4-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase cleaving both cellulose and cello-oligosaccharides [J]. J Biol Chem, 2014, 289(5): 2632-2642.

[41] Bennati-Granier C, Garajova S, Champion C, et al. Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide

monooxygenases secreted by *Podospora anserina* [J]. Biotechnol Biofuels, 2015, 8: 90.

[42] Simmons TJ, Frandsen KEH, Ciano L, et al. Structural and electronic determinants of lytic polysaccharide monooxygenase reactivity on polysaccharide substrates [J]. Nat Commun, 2017, 8: 1064.

[43] Liu B, Olson Å, Wu M, et al. Biochemical studies of two lytic polysaccharide monooxygenases from the white-rot fungus *Heterobasidion irregulare* and their roles in lignocellulose degradation [J]. PLoS One, 2017, 12(12): e0189479.

[44] Kosinas C, Chorozian K, Sandgren M, et al. Mutational study of a lytic polysaccharide monooxygenase from *Myceliophthora thermophila* (*Mt*LPMO9F): Structural insights into substrate specificity and regioselectivity [J]. Int J Biol Macromol, 2025, 288: 138574.

[45] Chalak A, Villares A, Moreau C, et al. Influence of the carbohydrate-binding module on the activity of a fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenase on cellulosic substrates [J]. Biotechnol Biofuels, 2019, 12: 206.

[46] Stepnov AA, Eijsink VGH, Forsberg Z. Enhanced *in situ* H_2O_2 production explains synergy between an LPMO with a cellulose-binding domain and a single-domain LPMO [J]. Sci Rep, 2022, 12: 6129.

[47] Borisova AS, Isaksen T, Dimarogona M, et al. Structural and functional characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase with broad substrate specificity [J]. J Biol Chem, 2015, 290(38): 22955-22969.

[48] Petrović DM, Várnai A, Dimarogona M, et al. Comparison of three seemingly similar lytic polysaccharide monooxygenases from *Neurospora crassa* suggests different roles in plant biomass degradation [J]. J Biol Chem, 2019, 294(41): 15068-15081.

[49] Danneels B, Tanghe M, Desmet T. Structural features on the substrate-binding surface of fungal lytic polysaccharide monooxygenases determine their oxidative regioselectivity [J]. Biotechnol J, 2019, 14(3): 1800211.

[50] Kraulis P J, Clore G M, Nilges M, et al. Structure of the cellulose-binding domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* [J]. Biochemistry, 1989, 28(23): 9245-9253

[51] Gao W, Li T, Zhou HC, et al. Carbohydrate-binding modules enhance H_2O_2 tolerance by promoting lytic polysaccharide monooxygenase active site H_2O_2 consumption [J]. J Biol Chem, 2024, 300(1): 105573.

[52] Westereng B, Arntzen MØ, Agger JW, et al. Analyzing activities of lytic polysaccharide monooxygenases by liquid chromatography and mass spectrometry [M]//Abbott DW, Lammerts van Bueren A. Protein-Carbohydrate Interactions: Methods and Protocols. New York: Springer, 2017: 71-92.

[53] Wang DM, Li YP, Zheng YT, et al. Recent advances in screening methods for the functional investigation of lytic polysaccharide monooxygenases [J]. Front Chem, 2021, 9: 653754.

[54] Westereng B, Agger JW, Horn SJ, et al. Efficient separation of oxidized cello-oligosaccharides generated by cellulose degrading lytic polysaccharide monooxygenases [J]. J Chromatogr A, 2013, 1271(1): 144-152.

[55] de Oliveira Gorgulho Silva C, Santos Teixeira T, Rodrigues KB, et al. Combination of MALDI-TOF MS and UHPLC-ESI-MS for the characterization of lytic polysaccharide monooxygenase activity [J]. Anal Methods, 2020, 12(2): 149-161.

[56] 陈凌宇, 李志建, 刁文涛, 等. 裂解多糖单加氧酶的研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(8): 393-400.
Chen LY, Li ZJ, Diao WT, et al. Research progress on lytic polysaccharide monooxygenases [J]. Food Ferment Ind, 2024, 50 (8): 393-400.

[57] Sørlie M, Keller MB, Westh P. The interplay between lytic polysaccharide monooxygenases and glycoside hydrolases [J]. Essays Biochem, 2023, 67(3): 551-559.

[58] Keller MB, Badino SF, Røjel N, et al. A comparative biochemical investigation of the impeding effect of C1-oxidizing LPMOs on cellobiohydrolases [J]. J Biol Chem, 2021, 296: 100504.

[59] Hamann PRV, Vacilotto MM, Segato F, et al. *Aspergillus fumigatus* lytic polysaccharide monooxygenase *Af*LPMO9D: biochemical properties and photoactivation of a multi-domain AA9 enzyme [J]. Processes, 2023, 11(11): 3230.

[60] Nguyen H, Kondo K, Yagi Y, et al. Functional and structural characterizations of lytic polysaccharide monooxygenase, which cooperates synergistically with cellulases, from *Ceriporiopsis subvermispora* [J]. ACS Sustainable Chem Eng, 2022, 10(2): 923-934.

[61] Ezeilo UR, Zakaria II, Huyop F, et al. Enzymatic breakdown of lignocellulosic biomass: the role of glycosyl hydrolases and lytic polysaccharide monooxygenases [J]. Biotechnol Biotechnol Equip, 2017: 1-16.

[62] Ma L, Li GQ, Xu HM, et al. Structural and functional study of a novel lytic polysaccharide monooxygenase *c*PMO2 from compost sample in the oxidative degradation of cellulose [J]. Chem Eng J, 2022, 433: 134509.

[63] Yang BX, Xie CY, Xia ZY, et al. The effect of xylose reductase genes on xylitol production by industrial *Saccharomyces cerevisiae* in fermentation of glucose and xylose [J]. Process Biochem, 2020, 95: 122-130.

[64] Li F, Sun XJ, Yu W, et al. Enhanced konjac glucomannan hydrolysis by lytic polysaccharide monooxygenases and generating prebiotic oligosaccharides [J]. Carbohydr Polym, 2021, 253: 117241.

[65] 何君, 韩育梅, 刘敏, 等. 菊粉和低聚果糖对发酵乳品质的影响 [J]. 中国食品学报, 2019, 19(11): 116-123.
He J, Han YM, Liu M, et al. Effect of inulin and oligofructose on the quality of fermented milk [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2019, 19(11): 116-123.

[66] Kuhad RC, Gupta R, Singh A. Microbial cellulases and their

industrial applications [J]. Enzyme Res, 2011, 2011: 280696.

[67] Zhang QB, Zhai YJ, Yao SQ, et al. Stepwise transform sugarcane bagasse into xylooligosaccharides and fermentable glucose by hydrothermal-xylanase-acid-cellulase hydrolysis [J]. Ind Crops Prod, 2023, 206: 117676.

[68] Zhang B, Zhang J, Wang DM, et al. Simultaneous fermentation of glucose and xylose at elevated temperatures co-produces ethanol and xylitol through overexpression of a xylose-specific transporter in engineered *Kluyveromyces marxianus* [J]. Bioresour Technol, 2016, 216: 227-237.

[69] Zhang RQ. Functional characterization of cellulose-degrading AA9 lytic polysaccharide monooxygenases and their potential exploitation [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(8): 3229-3243.

[70] Liu YZ, Guo BT, Xia QQ, et al. Efficient cleavage of strong hydrogen bonds in cotton by deep eutectic solvents and facile fabrication of cellulose nanocrystals in high yields [J]. ACS Sustainable Chem Eng, 2017, 5(9): 7623-7631.

[71] Surendran G, Sherje AP. Cellulose nanofibers and composites: an insight into basics and biomedical applications [J]. J Drug Deliv Sci Technol, 2022, 75: 103601.

[72] Moreau C, Tapin-Lingua S, Grisel S, et al. Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) facilitate cellulose nanofibrils production [J]. Biotechnol Biofuels, 2019, 12: 156.

[73] Koskela S, Wang SN, Xu DF, et al. Lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) mediated production of ultra-fine cellulose nanofibres from delignified softwood fibres [J]. Green Chem, 2019, 21(21): 5924-5933.

[74] Hu J, Tian D, Renneckar S, et al. Enzyme mediated nanofibrillation of cellulose by the synergistic actions of an endoglucanase, lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) and xylanase[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 3195.

[75] Muraleedharan MN, Karnaouri A, Piatkova M, et al. Isolation and modification of nano-scale cellulose from organosolv-treated birch through the synergistic activity of LPMO and endoglucanases[J]. Int J Biol Macromol, 2021, 183: 101-109.

[76] Rossi BR, Pellegrini VOA, Cortez AA, et al. Cellulose nanofibers production using a set of recombinant enzymes [J]. Carbohydr Polym, 2021, 256: 117510.

（责任编辑　李楠）

生物技术通报
·综述与专论· BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):58-69

基于*CD163*基因编辑的抗蓝耳猪研究进展

赵芯悦[1,2] 曾威[1] 张立苹[1] 夏继桥[2*] 毕延震[1*]

（1.湖北省农业科学院畜牧兽医研究所 动物胚胎工程及分子育种湖北省重点实验室,武汉 430070; 2.河北科技师范学院动物科技学院,秦皇岛 066000）

摘 要： 猪繁殖与呼吸综合征（porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS）又名蓝耳病，是由猪繁殖与呼吸综合征病毒（porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV）引起的一种严重危害全球养猪业的重大疫病。由于PRRSV存在复杂的免疫逃逸与高频变异机制，传统疫苗防控难以达到预期效果。培育具有遗传抗性的猪种是从源头防控该病的关键，而基因编辑技术凭借精准靶向特定基因的优势，有效克服了传统育种周期长、效率低的瓶颈，为PRRS抗病育种提供了高效路径。猪CD163已被证实为PRRSV侵染宿主靶细胞不可或缺的关键受体，针对该受体的精准编辑及抗病种质创新已经成为猪育种领域国际研究前沿。本文系统综述了CD163受体的结构特征及其生理功能，全面梳理了基于该受体研制抗PRRS猪的基因编辑技术发展脉络。现有研究表明，针对靶点的编辑策略正经历着从早期的非精准破坏向关键结构域精细修饰的演变，在成功赋予猪只PRRS抗性的同时，能够最大程度保留CD163的核心生理功能。针对现有技术的局限性与实际产业需求，本文进一步探讨了该领域未来的重点突破方向：首先，基于单碱基编辑技术实现单氨基酸位点的精准替换是未来趋势，但亟须通过脱氨酶定向改造及隐蔽剪接位点的AI预测来克服旁观者效应与脱靶风险；其次，面对多病原共感染压力及PRRSV的其他辅助受体，单一靶向*CD163*存在局限性，探索*CD163*与其他受体或经济性状基因的多基因协同编辑是必然要求；最后，随着美国FDA等国际监管审批的破冰以及我国相关生物安全评价指南的加速完善，基因编辑抗PRRS猪正稳步迈向商业化应用，展现出广阔的产业化前景。以期为后续精准培育具备广谱、持久抗病能力的猪新品种提供理论支撑与前瞻性参考。

关键词： CD163受体；猪繁殖与呼吸综合征病毒；基因编辑；抗病育种；猪

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1417

Research Progress in *CD163* Gene Editing to Develop PRRSV-resistant Pigs

ZHAO Xin-yue[1,2] ZENG Wei[1] ZHANG Li-ping[1] XIA Ji-qiao[2*] BI Yan-zhen[1*]

（1. *Key Laboratory of Animal Embryo Engineering and Molecular Breeding of Hubei Province, Institute of Animal Sciences and Veterinary Medicine, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan* 430070; 2. *College of Animal Science and Technology, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao* 066000）

Abstract: Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), also known as blue-ear disease, is a major infectious disease caused by the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and poses a severe threat to the global swine industry. Due to the complex immune evasion mechanisms and high mutation rate of PRRSV, traditional vaccine-based prevention and control strategies often fail to achieve the desired efficacy. Breeding genetically resistant pig lines is therefore critical for controlling the disease at its source. Gene editing technologies, characterized by their ability to precisely target specific genomic loci, have effectively overcome the long cycles and low efficiency that plague conventional breeding approaches, thereby offering a highly efficient route for PRRS resistance breeding. Porcine CD163 has been identified as an indispensable key receptor for PRRSV infection of host target cells. Consequently, precise editing of the *CD163* gene and the creation of disease-resistant germplasm have emerged as highly competitive frontiers in swine genetics internationally. This review

收稿日期：2025-12-25

基金项目：湖北省重点研发计划（2025BBB015），湖北省自然科学基金创新群体项目（2024AFA027），湖北省生猪种业高质量发展项目（HBZY2023B006-04），湖北省中央引导地方科技发展专项（2025EIA014），湖北省农业关键核心技术攻关（HBNYHXGG2025-7）

*通信作者：毕延震 sukerbyz@126.com，夏继桥 xiajiqiao365@163.com

systematically summarizes the structural characteristics and physiological functions of the CD163 receptor and comprehensively traces the development of gene editing technologies used to generate PRRS-resistant pigs. Current research indicates that targeting strategies are evolving from early imprecise disruptions toward precise modifications of critical structural domains. This paradigm shift has successfully conferred PRRS resistance in pigs while largely preserving the core physiological functions of CD163. Addressing the limitations of current technologies and the practical needs of the swine industry, this review further discusses key directions for future breakthroughs. First, precise single-amino-acid substitution using base editing technology represents a major future trend; however, overcoming the bystander effect and off-target risks through rational engineering of deaminases and AI-based prediction of cryptic splice sites is urgently needed. Second, given the pressure from multi-pathogen co-infections and the presence of additional accessory receptors for PRRSV, targeting *CD163* alone has inherent limitations. Therefore, exploring multiplex synergistic editing of *CD163* alongside other receptor genes or economically relevant traits is an inevitable necessity. Finally, catalyzed by breakthrough international regulatory approvals (e.g., from the US FDA) and the ongoing refinement of biosafety evaluation guidelines in China, gene-edited PRRS-resistant pigs are steadily advancing toward commercial application, demonstrating vast industrialization prospects. Ultimately, this review aims to provide theoretical support and forward-looking references for the precision breeding of novel pig lines with broad-spectrum and durable disease resistance.

Keywords: CD163 receptor; porcine reproductive and respiratory syndrome virus; gene editing; disease-resistant breeding; pig

猪繁殖与呼吸综合征（porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS）是由猪繁殖与呼吸综合征病毒（porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV）引起的一种严重危害全球养猪业的重大疫病，造成的经济损失惨重。该病毒主要侵害猪的骨髓、胸腺等中枢免疫器官，造成猪免疫缺陷，从而显著增加继发感染的易感性，严重破坏其免疫系统[1-2]。其感染导致的PRRS特征性临床症状主要表现为妊娠母猪的严重生殖障碍，以及仔猪和育肥猪的呼吸道症状，在大部分养猪业发达国家长期流行[3]。

上世纪末PRRSV在全球迅速分化为欧洲型（PRRSV-1）和美洲型（PRRSV-2）[4]。1996年，与PRRSV-2高度相似的CH-1毒株在我国华北地区发现后持续演化[5]。2006年，高致病性PRRSV（HP-PRRSV）大规模暴发，波及10余个省份，造成超200万头猪感染、40万头死亡的重大损失，一度成为当时的主要流行毒株[6]。然而，该流行格局随后因类NADC-30样等重组毒株的引入被彻底改变，这些毒株与本土毒株高频重组，自2017年起逐步取代HP-PRRSV成为主流，其后出现的类NADC-34样毒株及近期鉴定的PRRSV-1强毒株，进一步加剧了我国流行毒株的复杂性[7-10]。综上所述，PRRSV通过持续的突变、重组和强毒株更迭，在我国形成了多种基因型并存的复杂局面，其快速的遗传演变是其难以有效防控的根本原因。目前，防控PRRS的核心手段是疫苗接种与严格生物安全体系协同应用，其不仅无特效治疗药物，现有疫苗也无法提供充分保护，即使是定期接种疫苗的猪群也仍有发病的可能[8]。更为关键的是，PRRSV具有抗体依赖性增强作用（antibody-dependent enhancement, ADE），即PRRSV感染早期或疫苗接种后产生的非中和抗体或亚中和抗体反而会促进其复制，加剧感染[11]。这一特性也成为部分行业人员对PRRS疫苗的安全性、有效性存疑的核心原因之一。另外，目前部分猪场选择打造双阴场，通过生物安全措施维持群体的阴性状态，不能进行疫苗接种。因此，培育具有遗传抗性的猪种才是防控PRRS的根本路径。传统育种技术对抗病性状的选择周期长、效率低，而基因编辑技术，如CRISPR/Cas9技术，具有靶向性强、编辑效率高的核心优势，该技术能够精准、高效地编辑关键基因，显著缩短育种周期，并有望培育出具有先天抗性且生理功能完整的抗PRRS猪[12]。

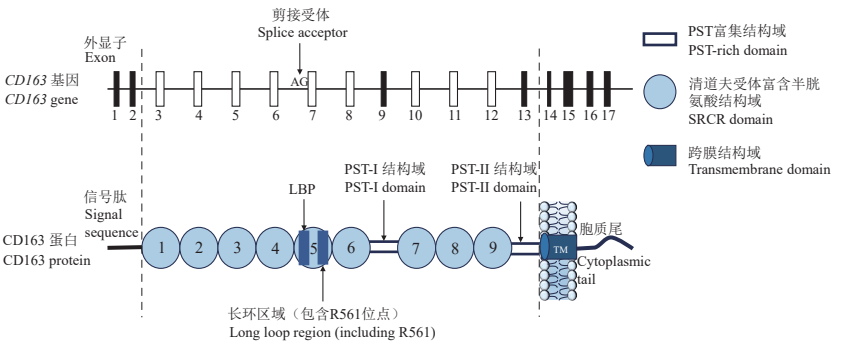
要实现精准的基因编辑抗病育种，深度解析病毒入侵机制及其关键宿主因子是首要前提。PRRSV的感染始于一个多种宿主因子参与的多步骤过程。在入侵初期，病毒可与硫酸乙酰肝素（heparan sulphate, HS）及唾液酸黏附素（sialoadhesin, Sn）等分子相互作用，介导其附着与内化[13-14]。然而，体内基因敲除研究证实，Sn并非PRRSV感染所必需的宿主因子[15]。进入细胞阶段，PRRSV既可通过网格蛋白介导的内吞进入内体，也可在凋亡模拟等机

制参与下经巨胞饮途径完成内化[16]。相比之下，CD163被反复证实为感染建立所必需的关键限制因子，其主要作用不在于介导初始的吸附或内化，而是决定内体阶段后续膜融合、病毒脱壳及基因组释放能否发生[13，17-18]。因此，当*CD163*缺失或其关键功能域被编辑后，PRRSV虽可被内吞，却因脱壳受阻而无法建立有效感染。综上所述，针对PRRSV感染所必需的关键受体CD163进行基因编辑，已成为培育抗PRRS猪最具潜力的策略之一[19-21]。本文综述CD163的结构与生理功能，并总结基于该受体研制抗PRRS猪的基因编辑技术研究进展。着重就基因编辑技术针对*CD163*在研制抗PRRS猪的最新应用进行阐述和分析，以期为后续培育抗PRRS猪新品种提供指导和参考。

1 猪CD163的结构特征及其生理功能

CD163属于清道夫受体富含半胱氨酸（scavenger receptor cysteine-rich, SRCR）超家族B类，是一种I型跨膜糖蛋白，其分子量约为130 kD，仅表达于成熟单核细胞与巨噬细胞表面，是巨噬细胞成熟分化的标志性分子之一，在猪体内扮演着重要的生理角色[22]。大量的研究已经证实，CD163是PRRSV感染靶细胞不可或缺的受体。探明CD163的分子结构，是利用基因编辑技术精准创制抗病猪群的理论前提。本节将系统梳理CD163的结构特征及生理功能等，为后续探讨靶向该基因的编辑策略提供依据。

*CD163*包含17个外显子，其编码的蛋白在结构上主要分为3个部分：胞外结构域、跨膜域以及细胞质尾。胞外结构域包含9个串联排列且富含半胱氨酸的SRCR结构域（SRCR1-SRCR9），是CD163发挥生理功能的核心区域[23]。在SRCR6和SRCR9结构域的C端，分别存在一段富含脯氨酸-丝氨酸-苏氨酸（PST）的基序，SRCR6结构域C端为35个氨基酸构成的PSTI，SRCR9结构域C端为16个氨基酸构成的PSTII[24]。其中，PSTII在结构上连接SRCR9、跨膜结构域及细胞质尾部，由于CD163蛋白主要通过其跨膜结构域锚定于细胞膜，因此PSTII虽不直接参与PRRSV的结合，但对于维持CD163在细胞膜上的正确定位至关重要[22]。细胞质尾位于细胞内，参与细胞的信号转导过程[22]（图1）。



空心方框表示主要编码CD163胞外SRCR结构域（SRCR1-SRCR9）的外显子；黑色实心方框表示主要编码非SRCR区域的外显子（包括信号肽、PST连接区、跨膜区及胞质尾等）

Open boxes represent exons that predominantly encode the extracellular SRCR domains (SRCR1-SRCR9) of CD163. Black filled boxes represent exons that predominantly encode non-SRCR regions, including the signal peptide, the PST linkers, the transmembrane domain, and the cytoplasmic tail

图1 猪*CD163*基因与蛋白结构及其抗PRRS编辑靶点示意图

Fig. 1 Schematic of porcine *CD163* gene and protein structure, and its editing targets for PRRS-resistance

猪CD163是一种多功能受体，其核心的生理功能是高效识别并清除触珠蛋白-血红蛋白（Hp-Hb）复合物，在溶血状态下，红细胞破裂释放出的血红蛋白（Hb）与血浆中的触珠蛋白（Hp）迅速结合形成Hp-Hb复合物，CD163通过其SRCR3结构域特异性识别并结合该复合物，介导巨噬细胞将其内吞后转运至溶酶体，过程中伴随血红素降解，产生胆绿素、游离铁离子和一氧化碳分子，该过程在溶血产物清除、铁代谢平衡维持和炎症反应调节中发挥重要作用[25-26]。此外，CD163还作为巨噬细胞表面重

要的免疫传感器参与机体免疫过程的调控，同时也作为成红细胞黏附受体和肿瘤坏死因子样凋亡微弱诱导剂（tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis, TWEAK）受体，参与红细胞生成和肿瘤细胞生长的调控过程[27-29]。而在养猪业中，CD163最受关注的功能是作为PRRSV入侵细胞的关键受体，其SRCR5结构域是介导PRRSV感染的必需区域，为攻克PRRS最具潜力的关键突破口之一[30]。已有大量研究通过体外实验证明了CD163在PRRSV感染中的关键地位。在包括猪肾细胞（如PK-15）、仓鼠肾细胞（BHK-21）、猫肾细胞（NLFK）乃至人源细胞（HEK 293T）和小鼠巨噬细胞（如RAW264.7）等多种原本非易感的细胞系中，均能通过基因工程手段异位表达猪源*CD163*，使其获得对PRRSV的易感性[19-20,23,31-33]。在原代猪肺泡巨噬细胞（porcine alveolar macrophage, PAM）中也能够精确调控*CD163*的表达水平，PRRSV的感染效率与细胞*CD163*表达量呈正相关，细胞的*CD163*表达量需要高到一定程度才能介导PRRSV感染，而低表达量的细胞则对PRRSV具有一定抗性[34]。此外，与*CD163* *m*RNA特异性结合的微小RNA（microRNA, miRNA）能够下调*CD163*表达量，使PAM获得对PRRSV感染的抗性[35]。因此，CD163在PRRSV感染过程中不可或缺，作为介导PRRSV感染的核心受体，是目前及未来PRRS防控中极具吸引力的理想遗传干预靶点。通过基因编辑技术靶向*CD163*以研制抗病猪种，是一项极具前景且高效的PRRS防控策略。

2　基于*CD163*研制抗PRRS猪的基因编辑技术体系与发展脉络

鉴于CD163在PRRSV感染中的决定性作用，靶向敲除或修饰*CD163*基因已成为培育抗蓝耳病猪的最有效策略之一。近年来，随着基因组编辑技术的飞速迭代，针对*CD163*的编辑策略也经历了从最初的非精准破坏到如今的单碱基等精准修饰的发展过程。目前，CRISPR/Cas9系统及其衍生技术构成了抗PRRS猪研制的核心技术体系。本节将梳理主流基因编辑技术在*CD163*靶向修饰中的应用脉络，并重点探讨不同技术路径在实现全基因敲除、关键结构域精准替换以及单碱基突变中的优势与最新突破。

2.1　CRISPR/Cas9系统在*CD163*基因编辑中的应用

2.1.1　CRISPR/Cas9系统在猪基因组编辑中的技术瓶颈与优化策略　随着CRISPR/Cas9在猪抗病育种中的深度应用，传统质粒递送与基础编辑逐渐暴露出高脱靶率、嵌合体比例高及同源定向修复（homology-directed repair, HDR）效率极低等实操瓶颈[36]。近年研究已转而聚焦于递送系统优化、靶向范围拓展及修复通路调控，以全面提升编辑效能。

在递送策略上，为克服质粒持续表达引发的脱靶及早期注射体系的嵌合难题，最新研究开发了Cas9核糖核蛋白（ribonucleoprotein, RNP）复合物递送方案。结合阳离子脂质体包裹与电穿孔技术，能够实现RNP在猪胚胎中的高效协同递送[37]。尽管基础研究证实RNP的瞬时活性可减少延迟切割与脱靶[38]，且该系统最大程度维持了胚胎体外发育潜能；但受限于猪胚胎复杂的DNA复制时相，高比例的遗传嵌合依然是目前直接递送法尚未彻底克服的局限[37, 39]。在靶向范围上，为打破经典SpCas9对PAM序列的严格限制，SpRY等宽PAM变体的开发几乎实现了无PAM限制靶向，极大地拓宽了可编辑区域[40]。此外，针对大动物体细胞中非同源末端连接（non-homologous end joining, NHEJ）占主导导致HDR效率低下的问题，最新策略通过引入特异性抑制NHEJ核心蛋白DNA-PKcs的小分子化合物，成功改变了细胞修复倾向，提升了精准片段替换的成功率[41]。

上述底层机制与工具的持续优化，为抗PRRS猪的创制奠定了坚实的技术基础。正是在这些前沿策略的推动下，针对CD163靶点的修饰才得以突破早期瓶颈，形成一条清晰的演进脉络：即从早期单纯依赖NHEJ引发移码突变以整体破坏受体蛋白，逐步进阶到利用HDR及修复通路干预来实现特定功能结构域的精准编辑。下文将依此逻辑，系统梳理CRISPR/Cas9介导的CD163靶向编辑策略的具体应用。

2.1.2　CRISPR/Cas9介导的*CD163*全基因敲除　CRISPR/Cas9介导的*CD163*全基因敲除，通常基于CRISPR/Cas9系统诱导DSB并利用NHEJ修复。通过设计特异性sgRNA靶向*CD163*基因的关键外显子，引导Cas9蛋白在目标位点进行切割，从而产生DSB。细

胞在修复此类断裂时，会优先启动易出错的NHEJ途径，导致切割位点附近发生随机的碱基插入或缺失。若此类突变引起阅读框移码，便可成功实现*CD163*基因的移码敲除，最终使其蛋白表达完全丧失，从而阻断PRRSV的入侵。

2014年，Whitworth等[42]首次通过CRISPR/Cas9系统结合NHEJ修复机制，敲除*CD163*制备抗PRRS猪。研究基于CRISPR/Cas9系统采用了2种技术路径：一是通过体细胞基因编辑结合体细胞核移植（somatic cell nuclear transfer, SCNT），针对*CD163*设计sgRNA，将其与Cas9质粒共转染猪胎儿成纤维细胞，sgRNA引导Cas9蛋白进行切割激活NHEJ修复，再结合SCNT通过胚胎移植获得*CD163*敲除猪；二是直接将CRISPR/Cas9系统注射进受精卵，将Cas9 mRNA与设计好的sgRNA直接注射到体外受精的受精卵胞质中，利用胚胎期细胞活跃的NHEJ修复机制实现*CD163*敲除，获得*CD163*敲除猪。值得注意的是，在体细胞路径中，尽管提供了HDR模板，但CRISPR/Cas9并未显著提高HDR效率，反而主要通过NHEJ诱导*CD163*发生大片段缺失。这一现象提示，在猪体细胞中NHEJ可能是主导的DNA修复机制，而HDR路径的效率受限。而在受精卵路径中，实现了近乎100%的基因编辑效率，嵌合体比例极低。这一成果不仅突破了传统SCNT中常见的发育异常问题，也大幅提升了基因编辑动物的生产效率。该团队又于次年验证，*CD163*全敲除猪对PRRSV具有完全抗性，且无抗体反应或病毒血症等临床症状，充分证明CD163在PRRSV感染中的必要性[43]。在此基础上，Yang等[44]选取全球核心养殖猪种杜洛克为实验对象并用HP-PRRSV对其进行攻毒，发现*CD163*全敲除杜洛克猪可完全抵御PRRSV感染，直接对接了养猪产业实际需求，凸显了基因编辑技术在抗病猪育种中的产业化应用价值。

以上研究虽效果显著，但NHEJ介导的敲除也存在明显局限。首先，其介导的突变类型难以控制，修复时导致的缺失或插入大小和位置不能精确掌握，可能影响邻近区域或基因，更无法进行精准编辑。其次，CD163作为多功能跨膜蛋白，参与多种生物学过程，全基因敲除虽阻断了病毒感染，但也可能影响猪的其他生理功能，存在未知的健康风险。已有体内研究表明，*CD163*全敲除编辑猪的血液中循环触珠蛋白水平升高，证实了CD163主要生理学功能的丧失[43, 45]。并且还有研究证实，*CD163*全敲除猪肌肉中的铁含量显著升高，提示其血红素清除途径受阻[46]。因此，超越单纯的基因敲除，发展可保留基因正常功能的精准编辑策略，已成为实现该技术产业化应用的核心目标。

2.1.3 CRISPR/Cas9介导的*CD163*关键结构域精准编辑 为解决*CD163*全敲除可能导致的多个问题，针对其关键病毒结合结构域进行精准修饰至关重要。实现精准编辑主要依赖两大技术策略：一是利用双sgRNA策略，结合NHEJ实现目标DNA片段的精准删除；二是利用HDR结合供体模板，实现序列的精准替换或点突变。前者通过在目标区域两侧设计切割位点，精准移除特定外显子或结构域，操作相对简便且效率较高。后者则引入含同源臂和缺失区域替换序列的HDR模板，利用细胞的HDR进行精准修复，既能定向删除*CD163*基因的目标区域，又能保留基因的其他功能区域。该HDR模板中，预设的缺失区域替换序列位于两同源臂之间，且序列设计直接跳过待删除区域，当细胞启动HDR以该模板为参照进行修复时，会自动将目标区域的编码序列排除于最终基因之外。此技术可产生无碱基随机增减、编辑结果完全可控的纯合缺失突变，从而严格确保仅移除目标区域，同时维持基因其余部分的结构与功能完整性。

此前研究已明确，*CD163*基因编码的SRCR5是PRRSV入侵宿主细胞的关键域[30]。鉴于*CD163*基因全敲除的局限性，对*CD163* SRCR5的编辑成为研究重点。Wells等[45]采用CRISPR/Cas9-HDR技术，将猪源CD163 SRCR5替换为人源CD163 SRCR8，结果显示，编辑猪对PRRSV-1具有完全抗性，但对PRRSV-2仅能降低感染效率，仍具有感染性。这一结果提示，SRCR5在PRRSV-1和PRRSV-2的感染机制中作用不同，人源替换未能完全阻断PRRSV-2的侵入。同期，Burkard等[18]则采用双sgRNA策略，靶向外显子7两侧内含子，利用NHEJ直接在受精卵中删除了*CD163*的外显子7（编码SRCR5），获得SRCR5缺失猪。发现编辑猪的巨噬细胞对PRRSV-1和PRRSV-2均完全抵抗，且其Hp-Hb清除等核心生

理功能未受影响。SRCR5的缺失阻断了PRRSV与CD163的结合，使PRRSV无法入侵，证实SRCR5是PRRSV入侵的必需结构域，而人源化替换可能改变了构象依赖性识别，导致PRRSV-2仍能利用其他区域或共受体完成感染。已有研究表明，*CD163* SRCR5的删除可有效阻断PRRSV的基因组释放，使抗性性状稳定遗传[47]。与*CD163*全敲除策略相比，SRCR5删除策略保留了与清除Hp-Hb复合物相关的CD163关键生物学活性，并在从出生到成熟的系统评估中未观察到肉质、肉色、生长性能、健康状况及繁殖能力等方面的显著差异[18，47–49]。需要指出的是，删除整个SRCR5仍属于对受体蛋白的较大规模改造。在现有证据支持安全性的基础上，进一步将编辑聚焦于SRCR5内与PRRSV相互作用的关键区域或特定的氨基酸残基，有望在更小结构变动下实现等效抗性，从而最大限度降低潜在脱靶生理效应与长期应用风险。

基于往年对CD163 SRCR5的结构解析研究，已明确SRCR5中参与PRRSV入侵的关键区域有位于第487–499位的配体结合口袋（ligand-binding pocket, LBP）和位于第544–570位的长环（long loop）区域[50–51]。Guo等[52]首次证实删除*CD163* SRCR5结构域的含LBP部分，可使编辑猪完全抵抗PRRSV-2感染。该研究采用双sgRNA策略，在目标区域两侧设计切割位点，利用NHEJ精准删除了SRCR5中包含LBP在内的41个氨基酸残基（aa 481–521），而非依赖HDR技术。所获编辑猪在强毒攻击下表现为完全抗性，且很大程度保留了CD163的生理功能，优于SRCR5缺失策略[52]。Xu等[21]则聚焦于Long loop区域，同样利用双sgRNA技术删除了SRCR5中包含Long loop部分区域的40个氨基酸残基（aa 523–562），发现该编辑同样能赋予永生化猪肺泡巨噬细胞系（immortalized porcine alveolar macrophage, IPAM）对PRRS的完全抗性。为进一步精确锁定关键位点，Xu等[21]针对该区域的第561位精氨酸（R），转换策略采用CRISPR/Cas9-HDR技术将R替换为丙氨酸（A），成功获得CD163-R561A编辑细胞系。结果显示，该点突变显著降低了IPAMs对PRRSV的易感性（病毒滴度下降约50%），但并未具备完全抗性[21]。该研究提示，R561是介导PRRSV感染的关键残基之一，但并非唯一决定因素，揭示了PRRSV与CD163受体相互作用的复杂性，存在多位点共同参与的可能。未来需要筛选并组合编辑多个关键残基，以期在最小化基因改动的前提下，实现对PRRS广谱、稳定的完全抗性。

早期研究还提示，CD163 PSTII参与PRRSV感染，该结构域由外显子13（编码前12个氨基酸）和外显子14（编码后4个氨基酸）共同构成，可成为培育抗PRRS猪的新突破口[30，53]。2024年，Salgado等[54]利用CRISPR/Cas9-HDR技术，在猪胎儿成纤维细胞中精确删除外显子13，再通过SCNT获得外显子13纯合缺失猪，并对其进行攻毒。结果发现删除外显子13可完全阻断PRRSV的感染，多数编辑猪Hp-Hb清除功能也未受严重影响，证实了CD163 PSTII中由外显子13编码的前12个氨基酸是介导PRRSV感染的关键部分。与前文对LBP和Long loop区域的编辑相比，该研究在保留CD163核心生理功能的前提下，在SRCR5内的编辑不仅更精简，还实现了对PRRS的完全抗性。此外，外显子13的删除未改变CD163的总体结构，避免了因蛋白错误折叠引发的副作用。在后续研究中，该团队将外显子13纯合缺失母猪与野生型公猪交配，获得杂合子胎儿。在妊娠后期对母体进行PRRSV攻毒后，外显子13纯合缺失母猪所怀的胎儿均未检测到病毒RNA，且无PRRSV相关病理变化；与此同时，野生型母猪的胎儿感染率高达94.7%，提示母体巨噬细胞中*CD163*的外显子13缺失阻断了PRRSV经胎盘传播的路径[55]。该研究进一步证实，通过HDR介导的*CD163*外显子13精准缺失可稳定遗传，且对母猪繁殖性能无不良影响，为抗PRRSV基因编辑育种提供了重要的安全性与可行性依据。

2.2　单碱基编辑技术在*CD163*基因编辑中的应用

单碱基编辑技术作为近年来兴起的一种革命性基因组编辑工具，能够在不产生DSB的前提下，实现对基因组DNA中特定碱基进行精确、高效转换[56]。其核心机制是将Cas9变体与特定碱基修饰酶融合，形成的蛋白质复合物通过sgRNA特异性结合靶序列后，利用修饰酶活性实现碱基转换，大幅降低细胞毒性与基因组不稳定性，提升编辑产物纯度[56]。目前应用最广泛的两类基础编辑器是胞嘧

啶碱基编辑器（cytosine base editors, CBEs）和腺嘌呤碱基编辑器（adenine base editors, ABEs）。CBEs通常由失活的Cas9蛋白（dead Cas9, dCas9）与胞嘧啶脱氨酶融合构成，通过sgRNA结合靶序列，在酶的催化作用下将胞嘧啶转化为尿嘧啶，从而将目标窗口内的C-G碱基对转换为T-A碱基对；ABEs则将Cas9n与定向进化的腺嘌呤脱氨酶融合，通过sgRNA结合靶序列，在酶的催化作用下将腺嘌呤转化为肌苷，肌苷在后续修复过程中被识别为鸟嘌呤，从而将靶向链窗口内的A-T碱基对转换为G-C碱基对[57-58]。后续研究也开发了糖基化酶碱基编辑器（glycosylase base editors, GBEs）、不依赖脱氨酶的胸腺嘧啶碱基编辑器（thymine base editors, TBEs）等多个拓展工具[59-60]。

前述CRISPR/Cas9技术不仅受限于其编辑精度与范围，其依赖的DSB修复机制也存在突变风险[61]。而单碱基编辑技术具有特异性、高效性、低脱靶性和无DSB等优势，可实现碱基精准转换。利用单碱基编辑技术编辑*CD163*基因培育抗PRRS猪，已成为基因编辑抗病育种领域的重要研究方向。近年来，碱基编辑技术已成功应用于*CD163*基因的抗PRRS定点改造。具体而言，CBE可将目标位点的胞嘧啶（C）转换为胸腺嘧啶（T），从而提前引入终止密码子，实现基因功能的敲除；而ABE则可将腺嘌呤（A）转换为鸟嘌呤（G），实现对剪接位点的精准编辑。赵为民等[62]利用YE1-BE3-FNLS系统在猪孤雌胚胎中成功将*CD163*第7外显子中的碱基C突变为T，成功引入终止密码子TAA，编辑效率达60%，且检测的潜在脱靶区域未发生突变。该研究展示了单碱基编辑器在胚胎水平的高效性与特异性。Wang等[63]构建并验证的hA3A-BE3NG系统进一步拓展了编辑范围，可识别NGN PAM序列，显著提高了靶向灵活性，成功在猪胎儿成纤维细胞中实现*CD163*等多基因的同时编辑，首次证明了单碱基编辑器在猪基因组中实现多位点精准编辑的可行性。然而ABE针对起始密码子ATG编辑时，无法像CBE通过提前引入终止密码子实现基因敲除[64]。外显子跳跃技术为ABE的应用提供了一种新策略。该策略利用ABE精准编辑基因剪接位点，诱导特定外显子在mRNA剪接中被跳过，导致移码突变或功能结构域破坏，实现基因敲除[65]。Zhao等[66]将多顺反子tRNA-gRNA加工系统（PTG）与ABE结合，构建一体化编辑载体，于猪肾成纤维细胞中利用该载体同步编辑*CD163*与肌肉抑制素（Myostatin，*MSTN*）基因；通过ABE介导的碱基编辑，在*CD163*的第6内含子和*MSTN*的第2内含子的剪切位点实现A→G（或互补链T→C）碱基转换，进而通过改造后的剪切位点诱导外显子7跳跃，从而避免SRCR5结构域的表达。该多基因编辑策略相比传统双载体共转染的多基因编辑策略显著提升了编辑效率，对*CD163*的编辑效率最高达52.8%，且未检测到DSB诱导的插入或缺失及sgRNA依赖性脱靶效应[66]。PTG系统与ABE结合，显著提升了多基因编辑的效率和可操作性，后续有望以该一体化载体技术为基础，进一步拓展单碱基编辑的多基因靶向范围，在保留CD163抗PRRS核心功能与编辑安全性的前提下，叠加更多优质生产性状的协同改良。本文对基于CD163受体研制抗PRRS猪的基因编辑技术代表性应用实例和具体编辑策略进行了总结，并汇总在表1和图2中。

3 展望

综上所述，基因编辑技术为抗PRRS猪的培育提供了多种简便、高效的方法。目前已经培育出的具有PRRS抗性且CD163核心生理功能未受影响的编辑猪，有力地证明了基因编辑技术在猪抗PRRS育种中具备显著优势。

近几年的研究对于CD163介导PRRSV感染的关键区域，逐步从基因、结构域缩小至局部氨基酸片段。今后的研究仍需进一步缩小编辑范围，靶向单个关键氨基酸位点。CRISPR/Cas9技术虽已实现广泛应用，但其固有的局限性使其难以满足该类精准编辑的需求。通过引入单核苷酸突变特异性改变关键氨基酸，远比对基因进行敲除或大片段破坏更安全，能最大程度保留CD163的生理功能。利用单碱基编辑技术对*CD163*关键氨基酸位点进行编辑，是未来培育抗PRRS猪的重要方向，其应用有三大问题亟待解决。第一，应在活体水平验证编辑后猪只对PRRS的真实抗性，包括攻毒实验和生理功能评估等，确保该技术具备可靠的产业应用价值。第二，单碱基编辑技术普遍存在旁观者效应，导致编辑窗

表1　基于CD163受体研制抗PRRS猪的基因编辑技术代表性应用实例

Table 1　Application of gene editing technologies for developing PRRS-resistant pigs via CD163 receptor targeting

基因编辑技术 Gene editing technologies	编辑靶点 Targeting site	编辑结果 Editing results	参考文献 References
CRISPR/Cas9-NHEJ	*CD163*	移码突变，大片段缺失 Frameshift mutation，large fragment deletion	[42]
		移码突变 Frame shift mutation	[43-44]
CRISPR/Cas9-HDR	SRCR5	人源CD163 SRCR8结构域替换 Replacement with human CD163 SRCR8	[45]
		删除 Deletion	[18]
	LBP	含LBP在内的41个氨基酸删除 Deletion of 41 amino acids containing the LBP	[52]
	Long loop	含loop 5-6部分区域的40个氨基酸删除 Deletion of 40 amino acids containing part of loop 5-6	[21]
	R561	第561位的精氨酸(R)替换为丙氨酸(A) An arginine (R) to alanine (A) substitution at position 561	[21]
	PSTII	前12个氨基酸删除 Deletion of the first 12 amino acids	[54]
单碱基编辑技术	外显子7 Exon 7	胞嘧啶(C)到胸腺嘧啶(T)的转换 C was converted to T	[62]
Base editing technology	内含子6 Intron 6	剪接受体位点由AG突变为GG The splice acceptor site AG was mutated to GG	[66]

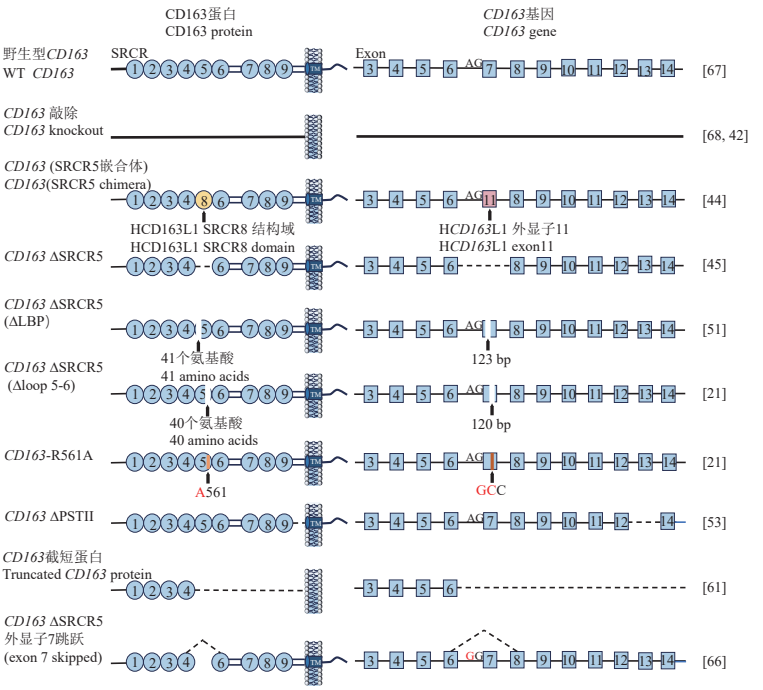


图2　基于CD163受体研制抗PRRS猪的基因编辑策略示意图

Fig. 2　Schematic of gene-editing strategies for generating PRRS-resistant pigs via CD163 receptor targeting

口特异性不足，可能引入脱靶风险。已有大量研究表明，对脱氨酶进行改造从而缩窄其有效编辑窗口，是降低旁观者效应的核心策略。因此，在保障猪*CD163*基因靶点编辑效率的前提下，如何通过脱氨酶定向改造进一步优化编辑窗口、降低旁观者效应，是单碱基编辑技术在猪抗PRRS育种中需重点突破的方向。第三，近日有研究发现，仅编辑*CD163*第7外显子的单一剪接受体不足以使编辑猪获得PRRS抗性[69]。提示经典剪接位点的突变可能激活邻近内含子中的隐蔽剪接位点，产生异常功能蛋白，即使目标剪接位点编辑成功，仍可能激活隐性剪接，影响预期抗病效果。未来可结合人工智能工具，在sgRNA设计阶段进行全基因组范围内隐蔽剪接位点预测，若能通过系统筛查，并在编辑目标剪接位点

的同时，同步破坏隐蔽剪接位点的识别序列，将大幅提升CD163功能失活的稳定性，同时降低因剪接异常导致非预期蛋白表达的安全风险。

仅对*CD163*进行单一基因编辑，难以有效抵御实际养殖中PRRSV的高频变异株感染，更无法应对多病原共感染，多基因编辑是必然趋势，已有研究成功验证了其可行性。如利用CRISPR/Cas9技术制备的*CD163*基因与传染性胃肠炎病毒（transmissible gastroenteritis virus, TGEV）侵入宿主的关键受体猪氨基肽酶N（porcine aminopeptidase N, *pAPN*）基因双敲除猪，可同时抵抗PRRSV与TGEV感染[46]。结合养猪业对抗病、高产等优良性状综合一体的需求，未来需进一步探索多基因协同编辑策略，通过靶向*CD163*与其他优良性状相关基因的组合编辑，培育多性状改良的突破性猪种，推动技术从单一抗性向综合效益转化。此外，目前已发现除*CD163*外，还有多个受体参与PRRSV的感染过程，如Sn[70]、硫酸乙酰肝素（heparan sulfate， HS）[71]、非肌肉肌球蛋白重链9（non-muscle myosin heavy chain 9, MYH9）[72]、新生儿Fc受体（neonatal Fc receptor, FcRn）[73]和Siglec-10[74]等。其中，FcRn近期被证实是PRRSV感染的关键受体[73]。与CD163类似，FcRn不参与病毒在细胞表面的附着与内化，而是在酸性早期内体中与病毒粒子相互作用，介导病毒的脱壳及后续的基因组释放。由于PRRSV可能借助其他受体或协同机制实现感染，单一靶向*CD163*的策略仍存在感染风险。因此，未来研究应系统解析不同受体与PRRSV的互作机制，探索通过多基因编辑协同调控关键受体，有望培育出具有广谱、持续抗病能力的猪种，为从根本上控制PRRS提供更有前景的方向。基因编辑抗病猪的商业化进程及其监管环境的优化亦是未来的关注焦点。目前，国际监管层面已取得标志性进展。美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration, FDA）已批准了抗PRRS基因编辑猪用于繁育和食品，为同类产品的全球产业化提供了明确参照。我国的基因编辑监管体系也在同步加速构建与完善。在《农业用基因编辑植物安全评价指南（试行）》先行先试的政策基础上，针对农业用基因编辑动物的安全评价指南也在加快制定，有望为抗PRRS猪等基因编辑动物的产业化提供明确的政策指引。随着相关法规政策的完善和公众认可度的提高，基因编辑抗PRRS猪的商业化应用前景可期。

参考文献

[1] Liu GQ, Huang XY, Yang YB, et al. GP2a I118 and GP4 D43 play critical roles in the attachment of PRRSV to the CD163 receptor: implications for anti-PRRSV infection targets [J]. J Virol, 2025, 99(9): e00963-25.

[2] 郭赛楠, 潘琳, 牛明福. 猪繁殖与呼吸综合征病毒逃逸宿主免疫反应机制的研究进展 [J]. 中国预防兽医学报, 2023, 45(12): 1309-1316.
Guo SN, Pan L, Niu MF. Research progress of immune escape mechanism of PRRSV [J]. Chin J Prev Vet Med, 2023, 45(12): 1309-1316.

[3] Weng CZ, Huang XX, Chen ZA, et al. Genetic evolution, epidemic trends, and recombination dynamics of PRRSV-1 in China [J]. Front Vet Sci, 2025, 12: 1632917.

[4] Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents [J]. J Virol, 1999, 73(1): 270-280.

[5] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等. 从疑似PRRS流产胎儿分离PRRSV的研究 [J]. 中国畜禽传染病, 1996, 18(2): 1-5.
Guo BQ, Chen ZS, Liu WX, et al. Isolation and identification of porcine reproductory and respiratory syndrome (PRRS) virus from aborted fetuses suspected of PRRS [J]. Chin J Prev Vet Med, 1996, 18(2): 1-5.

[6] Tian KG, Yu XL, Zhao TZ, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark [J]. PLoS One, 2007, 2(6): e526.

[7] Liu KY, Zhang K, Wang XD, et al. Characterization of a novel, virulent PRRSV-1 subtype 1 strain with intestinal tropism in China [J]. Microb Pathog, 2025, 208: 107951.

[8] Wang HL, Feng WH. Current status of porcine reproductive and respiratory syndrome vaccines [J]. Vaccines, 2024, 12(12): 1387.

[9] Zhao K, Ye C, Chang XB, et al. Importation and recombination are responsible for the latest emergence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China [J]. J Virol, 2015, 89(20): 10712-10716.

[10] Ren BH, Liu RY, Huang FB, et al. Isolation and pathogenicity of the novel porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 strain ZJ01 in South China [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2025, 15: 1646425.

[11] Chen XX, Zhou XY, Guo TD, et al. Efficacy of a live attenuated highly pathogenic PRRSV vaccine against a NADC30-like strain

challenge: implications for ADE of PRRSV [J]. BMC Vet Res, 2021, 17: 260.

[12] Bhatia S, Pooja, Yadav SK. CRISPR-Cas for genome editing: Classification, mechanism, designing and applications [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 238: 124054.

[13] Delputte PL, Costers S, Nauwynck HJ. Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin [J]. J Gen Virol, 2005, 86(5): 1441-1445.

[14] Van Breedam W, Van Gorp H, Zhang JQ, et al. The M/GP5 glycoprotein complex of porcine reproductive and respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner [J]. PLoS Pathog, 2010, 6(1): e1000730.

[15] Prather RS, Rowland RRR, Ewen C, et al. An intact sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) is not required for attachment/internalization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. J Virol, 2013, 87(17): 9538-9546.

[16] Wei X, Li R, Qiao SL, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus utilizes viral apoptotic mimicry as an alternative pathway to infect host cells [J]. J Virol, 2020, 94(17): e00709-20.

[17] Chen JY, Wang HT, Bai JH, et al. Generation of pigs resistant to highly pathogenic-porcine reproductive and respiratory syndrome virus through gene editing of *CD163* [J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(2): 481-492.

[18] Burkard C, Lillico SG, Reid E, et al. Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function [J]. PLoS Pathog, 2017, 13(2): e1006206.

[19] Calvert JG, Slade DE, Shields SL, et al. *CD163* expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses [J]. J Virol, 2007, 81(14): 7371-7379.

[20] Patton JB, Rowland RR, Yoo D, et al. Modulation of CD163 receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages [J]. Virus Res, 2009, 140(1/2): 161-171.

[21] Xu K, Zhou YR, Shang HT, et al. Pig macrophages with site-specific edited *CD163* decrease the susceptibility to infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. J Integr Agric, 2023, 22(7): 2188-2199.

[22] Rowland RRR, Brandariz-Nuñez A. Role of CD163 in PRRSV infection [J]. Virology, 2024, 600: 110262.

[23] Stoian AMM, Rowland RRR, Brandariz-Nuñez A. Mutations within scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) protein domain 5 of porcine CD163 involved in infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS) [J]. J Gen Virol, 2022, 103: 001740.

[24] 方鑫玉, 周磊, 杨汉春. 猪繁殖与呼吸综合征病毒受体CD163的研究进展 [J]. 中国兽医杂志, 2024, 60(12): 99-105.
Fang XY, Zhou L, Yang HC. Research progress on porcine reproductive and respiratory syndrome virus receptor CD163 [J]. Chin J Vet Med, 2024, 60(12): 99-105.

[25] Xu H, Song XH, Su XD. Calcium-dependent oligomerization of scavenger receptor CD163 facilitates the endocytosis of ligands [J]. Nat Commun, 2025, 16: 6679.

[26] Su CM, Rowland RRR, Yoo D. Recent advances in PRRS virus receptors and the targeting of receptor-ligand for control [J]. Vaccines, 2021, 9(4): 354.

[27] Moreno JA, Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, et al. The CD163-expressing macrophages recognize and internalize TWEAK potential consequences in atherosclerosis [J]. Atherosclerosis, 2009, 207(1): 103-110.

[28] Fabriek BO, Polfliet MMJ, Vloet RPM, et al. The macrophage CD163 surface glycoprotein is an erythroblast adhesion receptor [J]. Blood, 2007, 109(12): 5223-5229.

[29] Fabriek BO, van Bruggen R, Deng DM, et al. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria [J]. Blood, 2009, 113(4): 887-892.

[30] Van Gorp H, Van Breedam W, Van Doorsselaere J, et al. Identification of the CD163 protein domains involved in infection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. J Virol, 2010, 84(6): 3101-3105.

[31] Lee YJ, Park CK, Nam E, et al. Generation of a porcine alveolar macrophage cell line for the growth of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. J Virol Meth, 2010, 163(2): 410-415.

[32] Li LL, Wu CY, Hou GP, et al. Generation of murine macrophage-derived cell lines expressing porcine CD163 that support porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection [J]. BMC Biotechnol, 2017, 17: 77.

[33] Wang XP, Wei RF, Li QY, et al. PK-15 cells transfected with porcine *CD163* by PiggyBac transposon system are susceptible to porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. J Virol Meth, 2013, 193(2): 383-390.

[34] Wang TY, Liu YG, Li L, et al. Porcine alveolar macrophage CD163 abundance is a pivotal switch for porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection [J]. Oncotarget, 2018, 9(15): 12174-12185.

[35] Li N, Huang K, Chen YJ, et al. microRNA *ssc-miR-124a* exhibits antiviral activity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus via suppression of host genes *CD163* [J]. Vet Microbiol, 2021, 261: 109216.

[36] Ratner LD, La Motta GE, Briski O, et al. Practical approaches for knock-out gene editing in pigs [J]. Front Genet, 2021, 11: 617850.

[37] Lin QY, Otoi T, Widodo OS, et al. Synergistic enhancement of

clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9-mediated gene editing in porcine zygotes through combined lipofection and electroporation of cationic lipid-packaged ribonucleoproteins [J]. Vet World, 2025: 3806.

[38] Kim S, Kim D, Cho SW, et al. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins [J]. Genome Res, 2014, 24(6): 1012-1019.

[39] Hirata M, Wittayarat M, Namula Z, et al. Generation of mutant pigs by lipofection-mediated genome editing in embryos [J]. Sci Rep, 2021, 11: 23806.

[40] Peng ZW, Duan WX, Fan YH, et al. PAM-flexible SpCas9 variants expand the targeting scope for porcine genome editing and cellular disease modeling [J]. BMC Biotechnol, 2026, 26(1): 83.

[41] Zhao YJ, Li XY, Liu C, et al. Improving the efficiency of CRISPR ribonucleoprotein-mediated precise gene editing by small molecules in porcine fibroblasts [J]. Animals, 2024, 14(5): 719.

[42] Whitworth KM, Lee K, Benne JA, et al. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from *in vitro*-derived oocytes and embryos [J]. Biol Reprod, 2014, 91(3): 78.

[43] Whitworth KM, Rowland RRR, Ewen CL, et al. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Nat Biotechnol, 2016, 34(1): 20-22.

[44] Yang HQ, Zhang J, Zhang XW, et al. *CD163* knockout pigs are fully resistant to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Antivir Res, 2018, 151: 63-70.

[45] Wells KD, Bardot R, Whitworth KM, et al. Replacement of porcine CD163 scavenger receptor cysteine-rich domain 5 with a CD163-like homolog confers resistance of pigs to genotype 1 but not genotype 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. J Virol, 2017, 91(2): e01521-16.

[46] Xu K, Zhou YR, Mu YL, et al. *CD163* and *pAPN* double-knockout pigs are resistant to PRRSV and TGEV and exhibit decreased susceptibility to PDCoV while maintaining normal production performance [J]. eLife, 2020, 9: e57132.

[47] Nesbitt C, Galina Pantoja L, Beaton B, et al. Pigs lacking the SRCR5 domain of CD163 protein demonstrate heritable resistance to the PRRS virus and no changes in animal performance from birth to maturity [J]. Front Genome Ed, 2024, 6: 1322012.

[48] Burkard C, Opriessnig T, Mileham AJ, et al. Pigs lacking the scavenger receptor cysteine-rich domain 5 of CD163 are resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 infection [J]. J Virol, 2018, 92(16): e00415-18.

[49] Wang HT, Shen LC, Chen JY, et al. Deletion of *CD163* exon 7 confers resistance to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory viruses on pigs [J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(9): 1993-2005.

[50] Van Gorp H, Delputte PL, Nauwynck HJ. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy [J]. Mol Immunol, 2010, 47(7/8): 1650-1660.

[51] Ma HF, Jiang LG, Qiao SL, et al. The crystal structure of the fifth scavenger receptor cysteine-rich domain of porcine CD163 reveals an important residue involved in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection [J]. J Virol, 2017, 91(3): e01897-16.

[52] Guo CH, Wang M, Zhu ZB, et al. Highly efficient generation of pigs harboring a partial deletion of the *CD163* SRCR5 domain, which are fully resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 infection [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1846.

[53] Stoian AMM, Rowland RRR, Brandariz-Nuñez A. Identification of CD163 regions that are required for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection but not for binding to viral envelope glycoproteins [J]. Virology, 2022, 574: 71-83.

[54] Salgado B, Rivas RB, Pinto D, et al. Genetically modified pigs lacking *CD163* PSTII-domain-coding exon 13 are completely resistant to PRRSV infection [J]. Antivir Res, 2024, 221: 105793.

[55] Rowland RRR, Salgado B, Lowe J, et al. Deletion of maternal *CD163* PSTII-domain-coding exon 13 protects fetuses from infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) [J]. Vet Microbiol, 2024, 298: 110255.

[56] Liang YH, Chen FB, Wang KP, et al. Base editors: development and applications in biomedicine [J]. Front Med, 2023, 17(3): 359-387.

[57] Wang DW, Zhang YZ, Zhang JN, et al. Advances in base editing: a focus on base transversions [J]. Mutat Res Rev Mutat Res, 2024, 794: 108515.

[58] 赵无迪, 黄国斌, 朱向星, 等. 碱基编辑技术在猪遗传改良中的应用研究进展 [J]. 生物工程学报, 2023, 39(10): 3936-3947.
Zhao WD, Huang GB, Zhu XX, et al. Application of single base editing technique in pig genetic improvement: a review [J]. Chin J Biotechnol, 2023, 39(10): 3936-3947.

[59] Ye LJ, Zhao DD, Li J, et al. Glycosylase-based base editors for efficient T-to-G and C-to-G editing in mammalian cells [J]. Nat Biotechnol, 2024, 42(10): 1538-1547.

[60] Tong HW, Wang HQ, Wang XC, et al. Development of deaminase-free T-to-S base editor and C-to-G base editor by engineered human uracil DNA glycosylase [J]. Nat Commun, 2024, 15: 4897.

[61] 高靖静. 胞嘧啶单碱基编辑器编辑结果的分析与建模预测 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2022.
Gao JJ. Analysis and modeling prediction of cytosine single base editor editing results [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2022.

[62] 赵为民, 王慧利, 曹少先, 等. 猪 *CD163* 基因的单碱基编辑研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(4): 1041-1050.
Zhao WM, Wang HL, Cao SX, et al. The study of base editing of porcine *CD163* gene [J]. Acta Vet Zootechnica Sin, 2022, 53(4):

1041-1050.

[63] Wang Y, Bi DF, Qin GS, et al. Cytosine base editor (hA3A-*BE3*-NG)-mediated multiple gene editing for pyramid breeding in pigs [J]. Front Genet, 2020, 11: 592623.

[64] Zheng SW, Zhong HW, Zhou XQ, et al. Efficient and safe editing of porcine endogenous retrovirus genomes by multiple-site base-editing editor [J]. Cells, 2022, 11(24): 3975.

[65] Chen M, Manley JL. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, 10(11): 741-754.

[66] Zhao WD, Zhu XX, Huang GB, et al. Application of multiple base-editing mediated by polycistronic tRNA-gRNA-processing system in pig cells [J]. Biotech & Bioengineering, 2025, 122(4): 779-791.

[67] Bu W, Creighton CJ, Heavener KS, et al. Efficient cancer modeling through CRISPR-Cas9/HDR-based somatic precision gene editing in mice [J]. Sci Adv, 2023, 9(19): eade0059.

[68] Mathew SM. Strategies for generation of mice via CRISPR/HDR-mediated knock-in [J]. Mol Biol Rep, 2023, 50(4): 3189-3204.

[69] Durazo-Martínez K, Chaudhari J, Sherry LM, et al. Modification of the splice acceptor in *CD163* exon 7 of pigs is insufficient to confer resistance to PRRSV [J]. Vet Microbiol, 2025, 304: 110450.

[70] Vanderheijden N, Delputte PL, Favoreel HW, et al. Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages [J]. J Virol, 2003, 77(15): 8207-8215.

[71] Delputte PL, Vanderheijden N, Nauwynck HJ, et al. Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages [J]. J Virol, 2002, 76(9): 4312-4320.

[72] Li LL, Xue BY, Sun WY, et al. Recombinant MYH9 protein C-terminal domain blocks porcine reproductive and respiratory syndrome virus internalization by direct interaction with viral glycoprotein 5 [J]. Antivir Res, 2018, 156: 10-20.

[73] Yang K, Dong JR, Li J, et al. The neonatal Fc receptor (FcRn) is required for porcine reproductive and respiratory syndrome virus uncoating [J]. J Virol, 2025, 99: e01218-24.

[74] Xie JX, Christiaens I, Yang B, et al. Molecular cloning of porcine Siglec-3, Siglec-5 and Siglec-10, and identification of Siglec-10 as an alternative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) [J]. J Gen Virol, 2017, 98(8): 2030-2042.

（责任编辑　李楠）

生物技术通报
·综述与专论· BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):70-80

患者来源肿瘤类器官在PROTAC开发中的应用

刘亚琪 李瑶宣 刘含霄 李孟娜 杨竞超 陈兵 杨凤堂* 李敬瑞*
（山东理工大学生命与医药学院，淄博 255000）

摘 要： 蛋白水解靶向嵌合体（proteolysis targeting chimeras, PROTAC）技术作为新一代靶向蛋白降解技术，利用细胞内的泛素-蛋白酶体系统（ubiquitin-proteasome system, UPS）特异性降解靶蛋白，现已成为抗肿瘤药物研发的核心热点，但该技术的临床转化仍受传统体外模型与临床实际疗效脱节的严重限制。患者来源肿瘤类器官（patient-derived tumor organoid, PDTO）可高度还原肿瘤的基因组及表观遗传特征、组织学结构、瘤内异质性，有望推动抗肿瘤药物的临床转化进程。PROTAC技术与PDTO的交叉融合已成为创新药物研发的新兴研究方向，在PROTAC个体化筛选与评价、耐药性克服、靶向“不可成药”靶点等方面都展现出极大的应用潜力。本文对PDTO在PROTAC开发中的研究现状进行梳理，分析这一交叉融合领域研究的优势、面临的挑战，以及可能的改进方向，旨在为PROTAC技术的临床转化与患者来源肿瘤类器官模型的应用拓展提供参考。

关键词： PROTAC技术；患者来源肿瘤类器官；交叉融合；个体化筛选；耐药性；不可成药靶点
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0330

Application of Patient-derived Tumor Organoids in PROTAC Development

LIU Ya-qi LI Yao-xuan LIU Han-xiao LI Meng-na YANG Jing-chao CHEN Bing YANG Feng-tang* LI Jing-rui*
(*School of Life Sciences and Medicine, Shandong University of Technology, Zibo* 255000)

Abstract: Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) represent a new generation of targeted protein degradation technology that harnesses the intracellular ubiquitin-proteasome system (UPS) to specifically degrade target proteins, and have become a central focus in anticancer drug development. However, the clinical translation of this technology remains severely limited by the discrepancy between results from traditional *in vitro* models and actual clinical efficacy. Patient-derived tumor organoid (PDTO) can faithfully recapitulate the genomic and epigenetic characteristics, histological architecture, and intratumoral heterogeneity of tumors, thereby offering great promise for advancing the clinical translation of anticancer drugs. The integration of PROTAC technology with PDTO has emerged as a promising direction in innovative drug development. This approach holds significant potential for applications such as personalized PROTAC screening and evaluation, overcoming drug resistance, and targeting previously undruggable targets. This article reviews the current state of research on PDTO in PROTAC development, analyzes the advantages and challenges in this interdisciplinary field, and discusses future directions for improvement, aiming to provide guidance for the clinical translation of PROTAC technology and the broader application of patient-derived tumor organoid models.

Keywords: PROTAC technology; patient-derived tumor organoids; interdisciplinary integration; personalized screening; drug resistance; undruggable targets

恶性肿瘤是全球主要死亡原因之一[1]，其临床治疗仍是全球公共卫生领域的一项重大挑战。自1997年首个靶向药物利妥昔单抗获批上市以来[2]，靶向治疗在过去近30年的时间里显著改变了肿瘤治

收稿日期：2026-03-24
基金项目：国家自然科学基金面上项目（32470811），国家级大学生创新创业训练计划项目（202510433067，202510433047），山东省自然科学基金项目（ZR2025MS362），淄博市医药卫生科研项目（20240203002）
*通信作者：杨凤堂 fengtangyang@163.com，李敬瑞 lijingrui@sdut.edu.cn

疗格局。然而，肿瘤靶向治疗仍面临三大挑战：一是目前的传统靶向治疗只能靶向少数可成药蛋白，对绝大多数“不可成药”靶点难以有效靶向；二是靶点突变、旁路激活等机制介导的获得性耐药频发，成为靶向治疗临床失败的重要原因之一；三是传统2D肿瘤细胞系、免疫缺陷动物等临床前研究模型难以充分模拟患者肿瘤的异质性及体内微环境，导致临床前药效结果与临床实际疗效严重脱节。

蛋白水解靶向嵌合体（proteolysis targeting chimeras, PROTAC）技术的诞生为解决上述靶向治疗难题提供了全新范式。PROTAC利用细胞内天然存在的泛素–蛋白酶体系统（ubiquitin-proteasome system, UPS）实现对靶蛋白的高效特异性催化降解，与传统小分子抑制剂相比具有靶向“不可成药”靶点及克服耐药等优势。以*MYC*原癌基因编码的转录因子为例，该蛋白因缺乏可供小分子药物结合的活性口袋而被长期视为“不可成药”靶点[3]。Lier等[4]开发的MYC靶向PROTAC降解剂MDEG-541在部分患者来源的胃肠癌类器官中具有显著抗肿瘤活性，为MYC这一经典“不可成药”靶点的药物研发提供了可行方案。目前已有超过20种候选药物进入血液肿瘤与实体瘤的I–III期临床试验[5]。其中，ARV-110[6]与ARV-471[7]分别在前列腺癌和乳腺癌中得到了临床初步验证，展现出优异的临床应用前景。然而，PROTAC临床验证的相关研究主要集中于细胞系或动物模型。传统2D细胞系难以评价PROTAC的3D肿瘤穿透性；动物模型存在种属差异，难以精准评估PROTAC在临床患者中的实际疗效与毒性。相比之下，患者来源肿瘤类器官（patient-derived tumor organoid, PDTO）能高度保留原发肿瘤的基因组及表观遗传特征、组织学结构、瘤内异质性[8]，能真实反映PROTAC在患者体内的实际效应，是目前最接近临床的体外模型。此外，传统小分子抑制剂常因靶点突变或旁路激活而失效，瘤内异质性进一步增加了耐药性克服的难度。基于此，Pulido等[9]研究发现，*KRAS*^{G12D}突变胰腺癌细胞系和患者来源类器官对小分子抑制剂MRTX1133均存在不同程度的耐药，而*KRAS*^{G12D}靶向PROTAC分子能够克服此类耐药性，并在类器官模型中抑制肿瘤生长；同样针对*KRAS*^{G12D}这一靶点，Jeon等[10]开发了选择性PROTAC降解剂CH091138，该降解剂可选择性地抑制*KRAS*^{G12D}突变型类器官生长，克服了瘤内异质性导致的小分子抑制剂耐药。

PROTAC技术凭借其靶向降解“不可成药”蛋白、克服耐药等优势，为靶向治疗提供了全新思路。PDTO可高度保留原发肿瘤的基因组特征、组织学结构和瘤内异质性，是目前最接近临床实际的体外评估模型。PROTAC与PDTO的交叉融合，实质上是将PROTAC的独特作用机制置于更接近临床实际的生物学背景下加以验证，有助于推动PROTAC的开发及临床转化。基于此，本文围绕PDTO在PROTAC个体化筛选与评价、耐药性克服、靶向“不可成药”靶点3个方向的研究，系统分析该交叉融合领域的优势、现存挑战及优化路径，旨在为推动PROTAC技术的临床转化与肿瘤精准治疗提供参考。

1　PROTAC技术与患者来源肿瘤类器官

PROTAC技术与患者来源肿瘤类器官模型的交叉融合是抗肿瘤药物研发的新兴方向。系统阐述PROTAC的作用机制与发展历程，明确PDTO的构建方法及生物学特性，是开展二者交叉融合研究的重要基础。

1.1　PROTAC技术的工作原理与发展历程

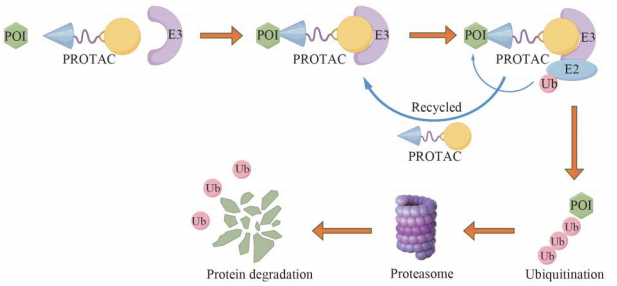
PROTAC分子由靶蛋白结合配体、E3泛素连接酶招募配体、连接2个配体的化学连接子3个核心元件构成，利用真核细胞内天然存在的泛素–蛋白酶体系统实现对靶蛋白的特异性降解。与传统小分子抑制剂、基因编辑技术、单克隆抗体等技术相比，PROTAC分子具有克服耐药、靶向“不可成药”靶点等突出优势（表1）。PROTAC的工作原理是通过双功能配体诱导靶蛋白与E3泛素连接酶[11]形成稳定的三元复合物，该复合物促使E3连接酶催化E2泛素结合酶向靶蛋白赖氨酸残基转移泛素分子，形成多聚泛素化标记，随后被26S蛋白酶体特异性识别并降解为短肽和氨基酸，而PROTAC分子可从降解后的复合物中释放出来，循环参与下一轮靶蛋白降解[12]（图1）。

在过去25年的时间里，PROTAC技术经历了从概念提出到临床转化的快速发展。Sakamoto等[13]于2001年首次报道了第一代PROTAC分子（PROTAC-1）；该分子以肽段为基本骨架，通过磷酸肽配体招募

表1 PROTAC与其他肿瘤治疗方法比较

Table 1 Comparison of PROTAC with other therapeutic modalities

比较维度 Comparison dimensions	蛋白水解靶向嵌合体 PROTAC	小分子化合物 Small molecule	基因编辑技术 CRISPR	单克隆抗体 Monoclonal antibody	小干扰RNA siRNA
作用于胞内靶点 Intracellular targets	Yes	Yes	Yes	No	Yes
全身给药 Systemic delivery	Yes	Yes	No	Yes	Yes
循环催化作用机制 Cyclic catalytic mode of action	Yes	No	No	No	No
口服生物利用度 Oral bioavailability	Yes	Yes	No	No	No
无可成药靶点限制 No druggable target constraint	Yes	No	Yes	No	Yes
肿瘤类器官适配性 Tumor organoid compatibility	Yes	Yes	Yes	No	Yes



图中展示了PROTAC利用细胞内泛素-蛋白酶体系统,特异性催化降解靶蛋白的完整循环过程。POI:靶蛋白;PROTAC:蛋白水解靶向嵌合体;E3:E3泛素连接酶;E2:E2泛素结合酶;Ub:泛素;Proteasome:26S蛋白酶体。橙色箭头指示反应正向流程;蓝色箭头指示PROTAC分子可从复合物中释放并循环参与下一轮降解反应

This figure illustrates the complete cycle of how PROTACs utilize the intracellular ubiquitin-proteasome system to specifically catalyze the degradation of target proteins. POI: Target protein. PROTAC: proteolysis targeting chimera. E3: E3 ubiquitin ligase. E2: E2 ubiquitin-conjugating enzyme. Ub: Ubiquitin. Proteasome: 26S proteasome. Orange arrows indicate the forward reaction flow; blue arrows indicate that the PROTAC molecule can be released from the complex and recycled for the next round of degradation

图1 PROTAC工作原理示意图(借助Figdraw自主绘制,下同)

Fig. 1 Schematic diagram of PROTAC working principle (self-drawn by Figdraw, the same below)

$SCF^{\beta\text{-}TRCP}$ E3连接酶来靶向降解甲硫氨酸氨肽酶2(methionine aminopeptidase 2, MetAP-2)。这一报道为PROTAC介导的蛋白降解提供了概念验证,但这些早期分子受限于细胞通透性差、代谢稳定性低、体外效价不足等缺点。第二代PROTAC的核心成果是研发出了全合成、可透膜的小分子PROTAC。2008年,Schneekloth等[14]首次设计并合成了可诱导雄激素受体(androgen receptor, AR)降解的PROTAC分子,该分子由非甾体类雄激素受体配体、靶向E3连接酶MDM2的配体Nutlin,以及聚乙二醇连接链三部分构成,具有良好的细胞膜穿透能力。在此基础上,E3连接酶的小分子配体被逐步发现[15],PROTAC的靶点范围快速拓展,首批PROTAC候选药物也于2019年进入临床试验[16](图2)。第三代PROTAC致力于解决前两代PROTAC的成药性局限并拓展其治疗功能,包括刺激响应型PROTAC[17]、多功能PROTAC(包括双靶点PROTAC)[18],以及用于肿瘤特异性递送的抗体-PROTAC偶联物(degrader-antibody conjugate, DAC)[19],基于新型E3连接酶的PROTAC[20]以及纳米制剂PROTAC[21]。

1.2 患者来源肿瘤类器官的构建及其生物学特性

类器官是由成体干细胞或多能干细胞在体外3D培养体系中经自组织形成的微型器官模型,与体内来源器官具有高度相似的组织学结构、细胞组成和功能特征[22]。自2009年荷兰Clevers团队首次成功构建小鼠肠道类器官[23]以来,类器官技术飞速发展,现已成功构建出涵盖消化、呼吸、泌尿、生殖等多个系统的正常组织类器官模型[24]。作为类器官技术在肿瘤研究领域的分支,患者来源肿瘤类器官[25]是指从患者肿瘤组织中分离得到的肿瘤细胞群在体外特定的3D培养体系中自组装形成的、与原发肿瘤高度一致的微型肿瘤模型。

患者来源肿瘤类器官的常规构建流程为:先从患者手术或穿刺标本中分离肿瘤干细胞,然后接种在含有特定生长因子的基质胶中进行3D培养,基质胶能为肿瘤干细胞提供类似基底膜的三维支架,使肿瘤干细胞能够自组装形成具有原发肿瘤组织学结构与分子特征的类器官模型[25](图3)。构建完成的PDTO需经过病理组织学染色、全基因组测序、拷贝

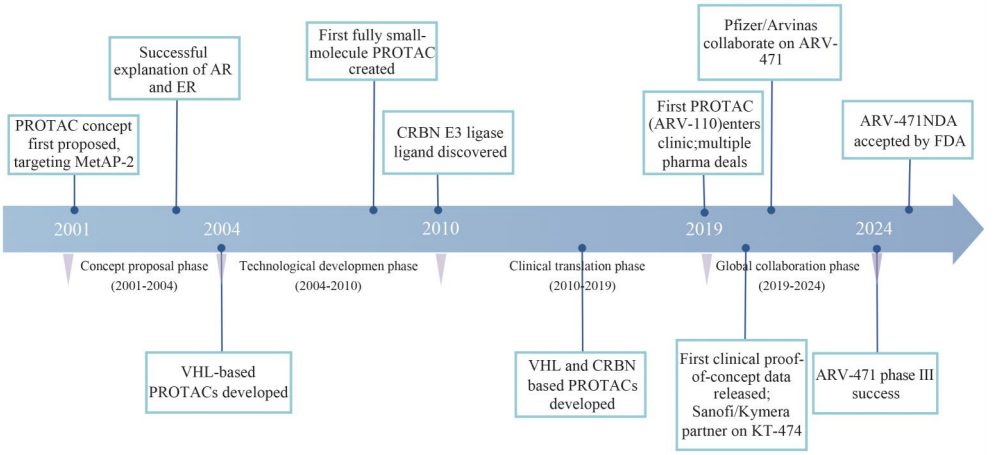


图2　PROTAC技术发展历程

Fig. 2　The timeline of PROTAC technology development

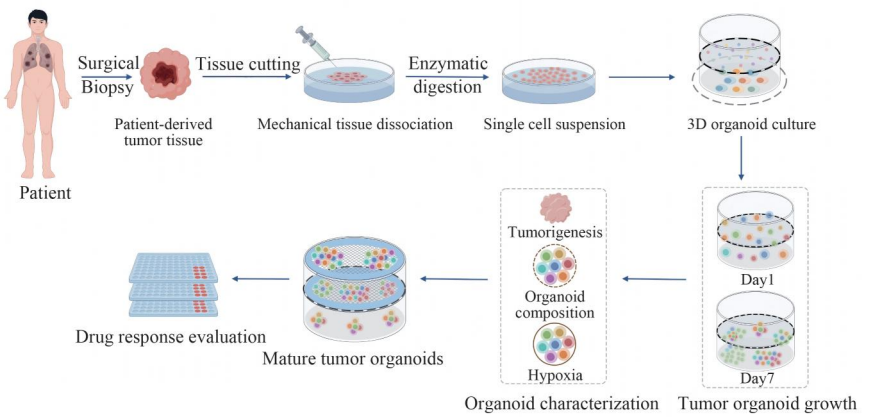


图3　患者来源肿瘤类器官的构建流程示意图

Fig. 3　Schematic diagram of patient-derived tumor organoid construction process

数变异分析等手段进行鉴定，验证类器官与原发肿瘤的一致性。

患者来源肿瘤类器官的核心生物学优势可归纳为4个方面：一是PDTO可长期、稳定地保留原发肿瘤的基因突变、拷贝数变异、表观遗传修饰等分子特征[26]，重现瘤内异质性；二是PDTO的药物反应与临床存在显著相关[27]，是预测临床疗效较为可靠的工具；三是可实现抗肿瘤药物的高通量筛选，PDTO可稳定传代、冻存复苏，因此可规模化构建类器官生物样本库，用于抗肿瘤药物的高通量筛选与药效评价[26]；四是可实现个体化治疗，从单个患者肿瘤组织直接构建PDTO，实现真正的精准治疗[27]（表2）。

2　患者来源肿瘤类器官在评估PROTAC中的应用

PROTAC的开发与临床转化需要更接近患者体内病理条件的评估模型，PDTO的3D培养体系可高度模拟实体瘤的细胞外基质屏障与体内生长微环境，能弥补传统临床前模型的缺陷，实现对PROTAC肿瘤穿透性、靶蛋白降解活性更为精准的评估；肿瘤

表2 患者来源肿瘤类器官与2D细胞系、动物模型的比较

Table 2 Comparison of patient-derived tumor organoids with 2D cell lines and animal models

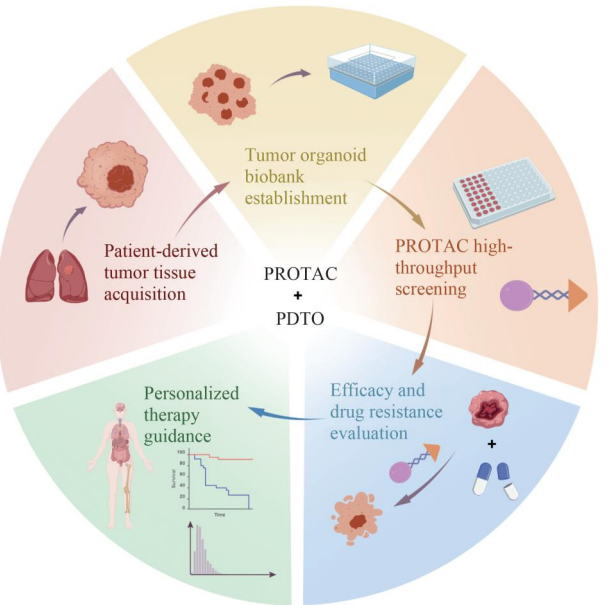
比较维度 Comparison dimensions	患者来源肿瘤类器官 Patient-derived tumor organoids	二维细胞系 2D cell lines	动物模型 Animal models
生理相关性 Physiological relevance	High	Low	High
肿瘤异质性 Tumor heterogeneity	High	Low	High
三维结构 3D structure	Present	Absent	Present
构建周期 Build cycle	Moderate	Short	Long
通量 Throughput	Moderate	High	Low
个体化治疗 Personalized therapy	High	Low	Low
成本 Cost	Moderate	Low	High

患者本身具有极强的异质性，这就导致同一PROTAC药物在不同患者中的疗效差异显著，而PDTO能更加真实地预测PROTAC的临床疗效，解决传统模型药效结果与临床脱节的问题。随着PROTAC技术与肿瘤类器官培养技术的不断成熟，二者的交叉融合研究已经取得一系列突破性进展，PDTO可用于PROTAC个体化筛选与评价、耐药性克服、靶向“不可成药”靶点等环节的评估，已成为肿瘤靶向治疗领域的研究热点（图4）。

2.1 基于患者来源肿瘤类器官的PROTAC个体化筛选与评价

抗肿瘤药物的筛选与药效评价受伦理规范及临床实操条件的双重限制，无法直接在人体内开展，肿瘤的患者间异质性导致同一PROTAC药物在不同患者体内疗效差异显著，患者来源的肿瘤类器官可高度重现患者的药物反应[28]，填补传统模型与人体试验之间的空白，成为PROTAC个体化筛选与评价的核心工具。

目前国内外已成功构建了涵盖乳腺癌、肺癌、结直肠癌、胰腺癌等高发瘤种的肿瘤类器官生物样本库[29]，这些生物样本库保留了原始肿瘤的异质性，可用于PROTAC的个体化筛选与评价。例如，Guo等[30]聚焦三阴性乳腺癌（triple-negative breast cancer, TNBC）中高表达的II型蛋白精氨酸甲基转移酶5（protein arginine methyltransferase 5, PRMT5），合成了新型PROTAC降解剂YZ-836P。实验结果显示，YZ-836P可使TNBC患者来源类器官结构破坏、出现坏死，并呈浓度依赖性抑制类器官生长。Padrão等[31]利用乳腺癌患者来源类器官模型，验证了靶向含三重基序蛋白24（tripartite motif-containing protein 24, TRIM24）的PROTAC降解剂在不同分子亚型乳腺癌中的抗肿瘤活性。结果显示，该降解剂对雌激素受体α（estrogen receptor α, ERα）阳性乳腺



图中展示了以PROTAC和PDTO为核心的研究体系，涵盖患者肿瘤组织采集、肿瘤类器官生物样本库建立、PROTAC高通量筛选、药效与耐药性评估及个体化临床治疗

This figure illustrates the research system centered on PROTAC and PDTO, covering the collection of patient tumor tissues, the establishment of a tumor organoid biobank, high-throughput PROTAC screening, evaluation of drug efficacy and resistance, and personalized clinical treatment

图4 基于患者来源肿瘤类器官的PROTAC开发全流程示意图

Fig. 4 Schematic diagram of the entire workflow for PROTAC development based on patient-derived tumor organoids

癌类器官具有显著抑制作用，而对ERα阴性类器官无显著影响。该研究通过区分不同分子亚型患者对TRIM24 PROTAC的响应差异，为乳腺癌患者的个体化治疗提供了筛选依据。除此之外，还有诸多研究利用患者来源肿瘤类器官对PROTAC分子进行了个体化筛选与评价，为PROTAC的临床应用奠定了基础。

患者来源肿瘤类器官还能应用于罕见肿瘤PROTAC个体化治疗的验证。Rose等[32]针对唾液腺腺样囊性癌（salivary gland adenoid cystic carcinoma, ACC）这一罕见肿瘤，构建了涵盖患者来源肿瘤类器官的ACC研究体系，并对靶向含溴结构域蛋白4（bromodomain-containing protein 4, BRD4）的PROTAC降解剂dBET6进行系统研究，发现dBET6在ACC类器官中的抗肿瘤活性显著优于传统抑制剂，可有效降低BRD4和髓细胞增生原癌基因蛋白水平。Jin等[33]利用一种罕见且侵袭性强的肾癌亚型——延胡索酸水合酶缺陷型肾细胞癌（fumarate hydratase-deficient renal cell carcinoma, FH-RCC）类器官，验证了PROTAC分子AU-15330的疗效，证实其能特异性抑制肿瘤类器官生长。在罕见肿瘤这一方向上开展的诸多研究，凸显了PROTAC的个体化治疗潜力，为PROTAC个体化应用提供了关键临床前依据。

现有研究已从高发瘤种和罕见肿瘤两个维度，证实了PDTO在PROTAC个体化筛选与评价中的应用。PDTO能够真实还原不同患者以及不同分子亚型肿瘤对PROTAC的敏感性差异，更加精准地匹配靶点特征与药物疗效，为PROTAC的个体化筛选与评价提供可靠的临床前依据，是推动PROTAC从基础研究向临床转化的关键支撑模型。

2.2　基于患者来源肿瘤类器官的PROTAC克服耐药

在临床治疗中，肿瘤细胞易通过靶点突变、旁路激活等机制产生获得性耐药[34]，无论是小分子靶向治疗还是传统化疗，均面临耐药频发的临床挑战。PROTAC技术凭借特异性降解靶蛋白、阻断异常信号通路的独特优势，成为克服耐药极具潜力的新策略。PDTO能高度模拟患者体内的肿瘤异质性和微环境，在PROTAC克服耐药方面展现出重要价值。

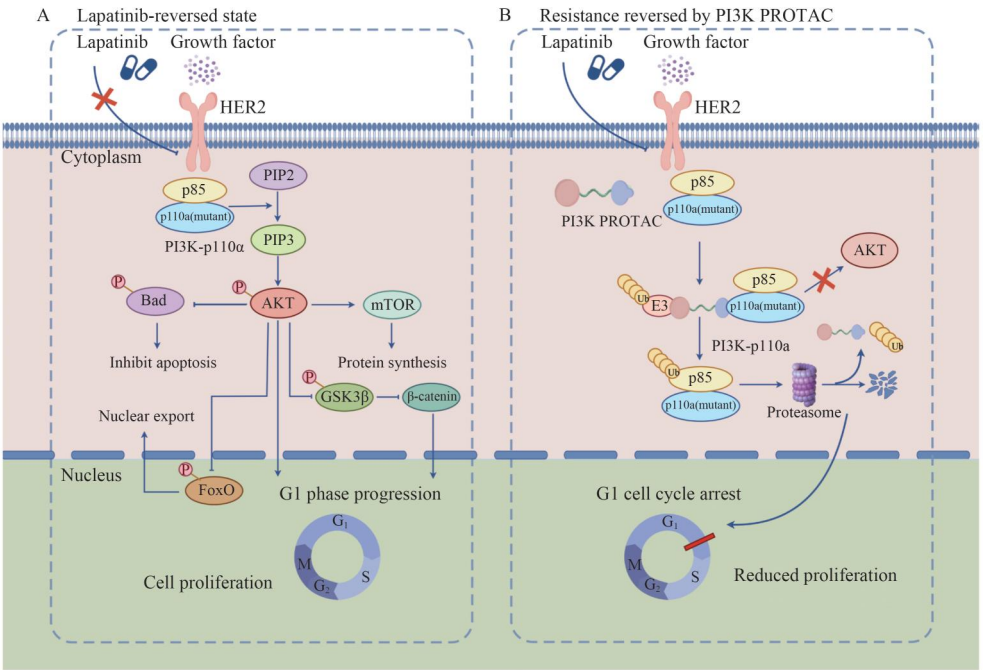
Zhang等[35]利用*PIK3CA*突变型人表皮生长因子受体2（human epidermal growth factor receptor 2, HER2）阳性乳腺癌患者来源类器官模型，验证了*PIK3CA*突变通过持续激活PI3K-AKT旁路信号通路，使肿瘤细胞脱离HER2上游信号调控，从而介导拉帕替尼耐药的核心分子机制。研究者进一步验证了自主研发的PI3K靶向PROTAC分子ZM-PI05可特异性降解突变型PI3K-p110α蛋白，阻断异常激活的PI3K-AKT通路，恢复肿瘤细胞对拉帕替尼的敏感性，逆转其耐药表型（图5）。Tolotto等[36]利用*FBXW7*突变的奥沙利铂耐药结直肠癌患者来源类器官模型，证实了靶向Ⅱa类组蛋白去乙酰化酶的PROTAC可有效逆转类器官的耐药性。此外，Brim等[37]针对雄激素受体剪接变异体7（androgen receptor splice variant 7, AR-V7）介导的去势抵抗性前列腺癌（castration-resistant prostate cancer, CRPC）耐药问题，在AR-V7阳性CRPC患者来源类器官模型中发现，靶向B细胞淋巴瘤-extra large蛋白（B-cell lymphoma-extra large, Bcl-xL）的PROTAC与髓样细胞白血病-1（myeloid cell leukemia-1, Mcl-1）抑制剂联用具有协同抗肿瘤效果，为克服AR-V7介导的CRPC耐药提供了新治疗策略。基于PDTO开展的上述研究证实了PROTAC逆转耐药的可行性，也为PROTAC的临床转化提供了实验支撑。

基于PDTO模型开展的耐药相关研究表明，PROTAC可通过特异性降解突变蛋白、阻断异常激活信号通路、恢复药物敏感性等方式逆转肿瘤耐药，而PDTO可真实还原临床肿瘤的耐药表型与异质性，成为验证PROTAC克服耐药能力、优化耐药治疗策略的理想临床前模型。

2.3　基于患者来源肿瘤类器官的PROTAC靶向“不可成药”靶点

传统小分子抑制剂的作用发挥依赖于靶蛋白表面的活性口袋，转录因子等蛋白因缺乏此类结构而长期被视为“不可成药”靶点[38]。PROTAC技术通过双功能配体同时招募靶蛋白和E3泛素连接酶，诱导靶蛋白经泛素–蛋白酶体系统被选择性降解，从而突破了活性口袋的结构限制，为靶向“不可成药”靶点提供了全新技术路径，而PDTO作为目前最接近临床肿瘤的体外模型，为PROTAC靶向“不可成药”靶点提供了理想平台。

以STAT家族的核心成员信号转导与转录激活因



A:PI3K-p110α蛋白持续激活导致的拉帕替尼耐药;B:PI3K PROTAC降解突变的p110α蛋白,阻断PI3K/AKT信号级联,逆转耐药

A: Lapatinib resistance caused by sustained activation of the PI3K-p110α protein. B: PI3K PROTAC degrades the mutated p110α protein, blocking the PI3K/AKT signaling cascade and ultimately reversing resistance

图5 基于乳腺癌类器官的PI3K PROTAC克服拉帕替尼耐药

Fig. 5 PI3K PROTAC overcomes lapatinib resistance in breast cancer organoids

子3（signal transducer and activator of transcription 3, STAT3）为例，该蛋白在头颈部鳞状细胞癌（head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC）、结直肠癌（colorectal cancer, CRC）等多种上皮源性肿瘤中呈持续性异常激活，驱动肿瘤增殖、侵袭及免疫逃逸[39]。然而，STAT3表面缺乏明确的酶催化位点和配体结合口袋，迄今尚无直接靶向STAT3的小分子抑制剂进入临床[40]。Jin等[41]基于天然产物川楝素开发了首个靶向STAT3的PROTAC分子TSM-1，该分子在STAT3依赖的HNSCC和CRC患者来源类器官模型中展现出显著的选择性降解活性和抗肿瘤效果。除STAT3外，β-连环蛋白（β-catenin）作为Wnt/β-catenin信号通路的核心转录共激活因子，在结直肠癌等多种肿瘤中异常激活，同样因缺乏可供小分子结合的活性口袋而难以直接靶向[42]。对此，Liao等[43]设计了靶向β-catenin的PROTAC分子xStAx-VHLL，并在结直肠癌患者来源类器官模型中证实其可高效降解β-catenin、显著抑制类器官存活。PDTO与PROTAC技术的交叉融合，有望推动针对STAT3、β-catenin等传统“不可成药”靶点的临床药物研发。

上述关于STAT3、β-catenin等经典“不可成药”靶点的相关研究表明，PROTAC可在PDTO模型中降解靶蛋白并发挥抗肿瘤活性，为“不可成药”靶点的药物研发提供了关键实验支撑。随着新型PROTAC分子的开发和PDTO模型的不断完善，二者的交叉融合有望攻克更多传统药物无法治疗的肿瘤类型。

3 患者来源肿瘤类器官在PROTAC应用中的优化

综合来看，PROTAC技术与肿瘤类器官模型的交叉融合，已成为肿瘤精准治疗领域的新兴方向。目前，肿瘤类器官在PROTAC的个体化筛选与评价、耐药性克服、靶向“不可成药”靶点等方面的应用已经取得了重要进展，充分证实了肿瘤类器官在推动PROTAC临床转化中的核心价值。然而，该交叉领域仍处于起步阶段，探讨肿瘤类器官在PROTAC应用中亟待优化的关键环节，并针对性地提出优化

策略，对于推动该领域的深入发展具有重要意义。

一是覆盖范围不均。现有研究多聚焦于类器官构建技术成熟的高发瘤种和雌激素受体、雄激素受体等经典激酶，对食管鳞癌等致密基质型高发瘤种、罕见肿瘤的探索较为有限。目前，罕见肿瘤类器官模型的探索性研究虽已取得初步进展，例如，Ringnalda等[44]于2025年建立了儿童小圆细胞肉瘤（small round cell sarcoma, SRCS）患者来源肿瘤类器官生物样本库，涵盖*EWSR1*::*FLI1*、*CIC*::*DUX4*等多种分子融合亚型，并通过药物筛选验证了其用于个体化治疗反应评估的可行性，该研究初步验证了罕见肿瘤类器官模型构建的可行性与临床转化潜力，但与高发瘤种相比，罕见肿瘤类器官的样本量与覆盖范围仍较为有限，亟待进一步扩充。对此，应突破难培养瘤种的类器官构建技术，优化致密基质肿瘤的组织解离方法与培养体系，提高模型构建成功率与传代稳定性，同时，收集罕见肿瘤临床标本，建立罕见肿瘤类器官生物样本库。

二是大多数患者来源肿瘤类器官模型仅包含肿瘤上皮细胞，缺乏免疫细胞（如T细胞、巨噬细胞）和基质细胞（如成纤维细胞、内皮细胞）等肿瘤微环境的关键组分，且长期传代过程中可能出现表型漂移，难以精准还原PROTAC在实体瘤中的穿透、靶蛋白降解等过程。Magré等[45]系统总结了类器官–免疫共培养模型的研究进展，指出类器官因缺乏自体免疫成分而难以准确评估患者免疫治疗的特异性反应，而共培养策略有望弥补这一缺陷。因此，开发PDTO与免疫/基质细胞的共培养模型以重构肿瘤微环境，是缩小肿瘤类器官模型与真实肿瘤差距的重要举措。例如，Li等[46]建立了肺癌类器官与配对外周血单个核细胞的凝胶–液体界面共培养模型，该模型与患者免疫治疗响应高度一致，为基于PDTO平台评估PROTAC在实体瘤微环境中的真实药效提供了技术支撑。

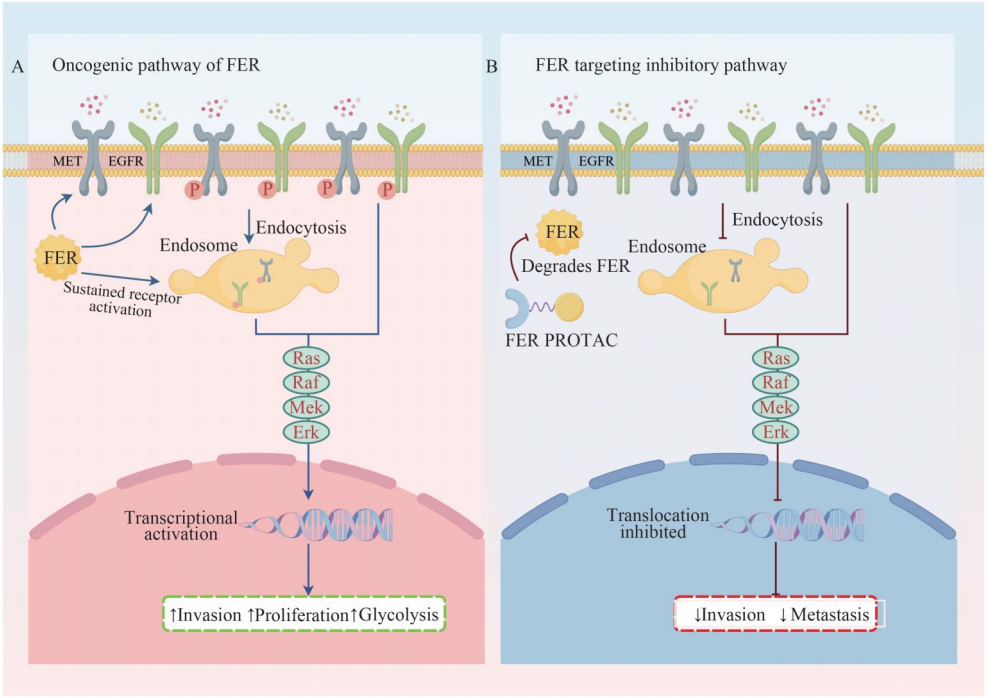
三是患者来源肿瘤类器官在PROTAC联合治疗、多通路阻断中的应用研究仍不足。在联合治疗策略中，Zhang等[35]开发的磷脂酰肌醇3-激酶（phosphoinositide 3-kinase, PI3K）PROTAC联合HER2抑制剂拉帕替尼，在HER2阳性、*PIK3CA*突变乳腺癌PDTO中证实二者可协同逆转HER2靶向治疗耐药，显著抑制耐药类器官的增殖。在多通路阻断策略中，Haughton等[47]利用患者来源的HNSCC类器官模型，揭示了FER酪氨酸激酶作为调控表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor, EGFR）和间质上皮转化因子受体（mesenchymal-epithelial transition factor receptor, MET）活性的上游整合节点的关键作用。研究者进一步设计了FER特异性PROTAC降解剂，并在HNSCC类器官模型中验证其疗效。结果显示，FER PROTAC可高效降解FER蛋白，其降解可同时抑制两条受体驱动的致癌通路，从而有效阻断肿瘤侵袭和转移（图6）。上述研究虽初步证实了PDTO在PROTAC联合治疗及多通路阻断中的可行性，但总体而言，该方向上的相关研究报道仍有限，难以为PROTAC的临床转化提供充分支撑。未来，需进一步拓展PDTO在联合治疗与多靶点协同干预中的系统研究，深入评估不同联合方案的协同机制及临床前疗效。

综上所述，PROTAC与PDTO的交叉融合虽已取得重要进展，但仍存在瘤种覆盖范围有限、肿瘤微环境模拟不足、联合干预与多通路调控研究相对较少等局限。未来，通过突破致密基质型肿瘤与罕见肿瘤的类器官构建技术、构建含免疫细胞与基质组分的共培养模型、拓展PROTAC联合用药及多靶点降解研究，可有效完善PDTO评估体系，进一步提升其在PROTAC研发与临床转化中的应用价值。

4　总结与展望

本文综述了患者来源肿瘤类器官在PROTAC开发中的应用。PROTAC技术通过泛素–蛋白酶体系统实现对靶蛋白的特异性降解，改变了传统靶向药物的作用模式，为解决肿瘤靶向治疗耐药、“不可成药”靶点等核心难题提供了全新范式。同时，PDTO是目前最接近临床肿瘤的体外模型，可高度还原患者肿瘤的基因组及表观遗传特征、组织学结构、瘤内异质性。二者交叉融合，实现了PROTAC从基础研究到临床转化的有效衔接，为PROTAC个体化筛选与评价、耐药性克服、靶向“不可成药”靶点提供了新思路。

然而，PROTAC与PDTO的交叉融合仍处于早期探索阶段，现有研究仍存在诸多局限性。一方面，现有药效评价指标多为形态学观察和细胞活力检测，



A:FER高表达通过双重调控机制持续激活MAPK通路并入核诱导相关基因转录,驱动肿瘤恶性进展;B:PROTAC降解剂靶向降解FER,逆转肿瘤侵袭与转移等恶性表型

A: High FER expression continuously activates the MAPK pathway through a dual regulatory mechanism and induces the transcription of related genes upon nuclear translocation, driving malignant tumor progression. B: PROTAC-based degraders specifically degrade FER, thereby reversing malignant phenotypes such as tumor invasion and metastasis

图6 FER介导的促癌信号通路及基于PDTO的PROTAC抑制

Fig. 6 FER-mediated oncogenic signaling pathways and PDTO-based PROTAC inhibition

对靶蛋白降解速率和最大降解程度等核心参数缺乏实时定量分析；研究模式则以“先开发候选分子，再用PDTO验证活性”为主，尚无预先利用PDTO筛选结果指导PROTAC分子设计的研究报道。另一方面，在PROTAC分子设计中，E3连接酶配体的选择多依赖经验性尝试[48]，尚未将PDTO的E3连接酶表达特征纳入分子优化流程，难以实现真正意义上的个体化治疗策略。

基于上述分析，未来研究可从以下3个方面展开。一是，以PDTO为核心验证模型，建立更精准的新型PROTAC的筛选与评价体系。例如，Riching等[49]利用HiBiT CRISPR技术对内源性靶蛋白进行标记，在二维细胞系中实时监测PROTAC的降解速率和最大降解程度，克服了传统Western blot技术在通量与定量精度上的局限。鉴于PDTO可高度保留肿瘤的组织学结构与瘤内异质性，可将HiBiT内源标记策略迁移至PDTO体系，在原生三维条件下实时追踪PROTAC在不同肿瘤区域的降解动力学差异，建立以PDTO为核心的高精准度性能筛选与评估体系。二是，改进现有研究范式。在PROTAC开发前期，引入不同分子分型的PDTO进行筛选，建立“PDTO筛选在前、分子优化跟进”的新型开发流程。三是，可对PDTO进行转录组测序或靶向蛋白质组学分析，定量检测CRBN、VHL、IAP等E3酶的蛋白或基因表达水平，明确患者肿瘤中哪些E3酶可供PROTAC招募、哪些表达过低不宜选用，据此选择最优E3配体。同时，在PDTO中原位比较不同连接子参数对靶蛋白降解效率的影响，确定最优连接子参数，完成从配体选择到连接子优化的系统验证。随着国内外基础研究的不断深入，二者的交叉融合有望推动肿瘤精准治疗进入全新阶段，为更多肿瘤患者带来切实的生存获益。

参考文献

[1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.

[2] Grillo-Lopez A, White C, Dallaire B, et al. Rituximab the first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2000, 1(1): 1-9.

[3] Whitfield JR, Soucek L. MYC in cancer: from undruggable target to clinical trials [J]. Nat Rev Drug Discov, 2025, 24(6): 445-457.

[4] Lier S, Sellmer A, Orben F, et al. A novel Cereblon E3 ligase modulator with antitumor activity in gastrointestinal cancer [J]. Bioorg Chem, 2022, 119: 105505.

[5] 马恒元, 柯志强, 苏正定. 蛋白降解靶向嵌合体的研究进展 [J]. 中国医药工业杂志, 2024, 55(11): 1467-1476, 1504.
Ma HY, Ke ZQ, Su ZD. Research progress on proteolysis targeting chimeras [J]. Chin J Pharm, 2024, 55(11): 1467-1476, 1504.

[6] Petrylak DP, Gao X, Vogelzang NJ, et al. First-in-human phase I study of ARV-110, an androgen receptor (AR) PROTAC degrader in patients (pts) with metastatic castrate-resistant prostate cancer (mCRPC) following enzalutamide (ENZ) and/or abiraterone (ABI) [J]. J Clin Oncol, 2020, 38(15_suppl): 3500.

[7] Flanagan JJ, Qian Y, Gough SM, et al. Abstract P5-04-18: ARV-471, an oral estrogen receptor PROTAC degrader for breast cancer [C]// Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2019. Atlanta: American Association for Cancer Research, 2019: P5-04-18.

[8] Seidlitz T, Stange DE. Gastrointestinal cancer organoids—applications in basic and translational cancer research [J]. Exp Mol Med, 2021, 53(10): 1459-1470.

[9] Pulido I, Gunder L, Luan Q, et al. Abstract 1932: Overcoming acquired resistance to *KRAS* (G12D) inhibition using a *KRAS*-HSP90 hetero-bifunctional small molecule therapeutic agent [C]// Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2024. Philadelphia, PA: American Association for Cancer Research, 2024: 1932.

[10] Jeon E, Kim C, Ko M, et al. $KRAS^{G12D}$ selective VHL-PROTAC with sparing $KRAS^{WT}$ and other *KRAS* mutants [J]. Eur J Med Chem, 2025, 297: 117928.

[11] Mi DZ, Li YZ, Gu HJ, et al. Current advances of small molecule E3 ligands for proteolysis-targeting chimeras design [J]. Eur J Med Chem, 2023, 256: 115444.

[12] Faryal B, Ul Abideen Z, Irfan M, et al. Targeted protein degradation in cancer: PROTACs, new targets, and clinical mechanisms [J]. Biomolecules, 2026, 16(2): 325.

[13] Sakamoto KM, Kim KB, Kumagai A, et al. Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(15): 8554-8559.

[14] Schneekloth AR, Pucheault M, Tae HS, et al. Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: En route to chemical proteomics [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2008, 18(22): 5904-5908.

[15] Testa A, Lucas X, Castro GV, et al. Correction to "3-fluoro-4-hydroxyprolines: synthesis, conformational analysis, and stereoselective recognition by the VHL E3 ubiquitin ligase for targeted protein degradation" [J]. J Am Chem Soc, 2019, 141(18): 7644.

[16] Li R, Liu M, Yang ZY, et al. Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) in cancer therapy: present and future [J]. Molecules, 2022, 27(24): 8828.

[17] 江幸羽, 陈奕诺, 张琬絮, 等. 刺激响应型PROTAC用于肿瘤精准治疗 [J]. 药学学报, 2025, 60(11): 3263-3282, 3262.
Jiang XY, Chen YN, Zhang WX, et al. Stimuli-activatable PROTAC for precise cancer therapy [J]. Acta Pharm Sin, 2025, 60(11): 3263-3282, 3262.

[18] Wei Y, Ma RR, Hong LJT. 379P development of bifunctional PROTAC degraders targeting EGFR and immune microenvironment [C]// Immuno-Oncology and Technology. Amsterdam: Elsevier, 2025: 379P.

[19] Wang L, Ke Y, He QY, et al. A novel ROR1-targeting antibody-PROTAC conjugate promotes BRD4 degradation for solid tumor treatment [J]. Theranostics, 2025, 15(4): 1238-1254.

[20] Liu HX, Ding XY, Liu LY, et al. Discovery of novel BCR-ABL PROTACs based on the cereblon E3 ligase design, synthesis, and biological evaluation [J]. Eur J Med Chem, 2021, 223: 113645.

[21] Minko T. Nanoformulation of BRD4-degrading PROTAC: improving druggability to target the 'undruggable' MYC in pancreatic cancer [J]. Trends Pharmacol Sci, 2020, 41(10): 684-686.

[22] 周永杰, 石毓君. 类器官研究进展及展望 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2022, 29(6): 716-718.
Zhou YJ, Shi YJ. Progress and prospects of organoid research [J]. Chin J Bases Clin Gen Surg, 2022, 29(6): 716-718.

[23] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche [J]. Nature, 2009, 459(7244): 262-265.

[24] Calà G, Sina B, De Coppi P, et al. Primary human organoids models: Current progress and key milestones [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2023, 11: 1058970.

[25] Acar A. Patient-derived tumor organoids: advances, applications, and future directions in biomedical research [J]. Front Med, 2026, 12: 1733668.

[26] Zhou LF, Liao HY, Han Y, et al. The use of organoids in creating immune microenvironments and treating gynecological tumors [J]. J Transl Med, 2024, 22: 856.

[27] Abouleila Y, Smabers LP, Voskuilen T, et al. Accelerating personalized medicine: miniaturized patient-derived organoid drug screening for predicting cancer treatment responses and beyond [J]. npj Biomed Innov, 2026, 3: 16.

[28] Li P, Huang ML, Li MY, et al. Combining molecular characteristics and therapeutic analysis of PDOs predict clinical responses and guide PDAC personalized treatment [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2025, 44: 72.

[29] Wijler L, Staes A, van Seeters L, et al. Abstract PR016: Largescale organoid panel drug screening to short-track clinically-relevant output [J]. Mol Cancer Ther, 2023, 22(12_Supplement): PR016.

[30] Guo YX, Li YZ, Zhou ZM, et al. Targeting PRMT5 through PROTAC for the treatment of triple-negative breast cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2024, 43(1): 314.

[31] Padrão N, Gregoricchio S, Eickhoff N, et al. TRIM24 as a therapeutic target in endocrine treatment-resistant breast cancer [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2025, 122(33): e2507571122.

[32] Rose AJ, Fleming MM, Francis JC, et al. Cell-type-specific tumour sensitivity identified with a bromodomain targeting PROTAC in adenoid cystic carcinoma [J]. J Pathol, 2024, 262(1): 37-49.

[33] Jin J, Luo J, Jin XD, et al. Chromatin helicase CHD6 establishes proinflammatory enhancers and is a synthetic lethal target in FH-deficient renal cell carcinoma [J]. Cancer Res, 2025, 85(4): 675-691.

[34] Omar EA, Rajesh R, Das PK, et al. Next-generation cancer therapeutics: PROTACs and the role of heterocyclic warheads in targeting resistance [J]. Eur J Med Chem, 2025, 281: 117034.

[35] Zhang HY, Zhang LL, He YN, et al. PI3K PROTAC overcomes the lapatinib resistance in *PIK3CA*-mutant HER2 positive breast cancer [J]. Cancer Lett, 2024, 598: 217112.

[36] Tolotto V, Gualandi N, Cortolezzis Y, et al. Class IIa HDACs forced degradation allows resensitization of oxaliplatin-resistant *FBXW7*-mutated colorectal cancer [J]. Mol Oncol, 2026, 20(3): 637-667.

[37] Brim BC, Leon AF, Beatson EL, et al. Direct co-targeting of bcl-xL and mcl-1 exhibits synergistic effects in AR-V7-expressing CRPC models [J]. Cancer Res Commun, 2025, 5(8): 1396-1408.

[38] Jung H, Lee Y. Targeting the undruggable: recent progress in PROTAC-induced transcription factor degradation [J]. Cancers, 2025, 17(11): 1871.

[39] 周旋, 任玉, 乔宇. STAT3在头颈部鳞癌中的研究进展 [J]. 天津医药, 2020, 48(6): 563-567.
Zhou X, Ren Y, Qiao Y. Research progress of STAT3 in squamous cell carcinoma of head and neck [J]. Tianjin Med J, 2020, 48(6): 563-567.

[40] Kang ZY, Li S, Li Y, et al. Small molecular inhibitors and degraders targeting STAT3 for cancer therapy: an updated review (from 2022 to 2024) [J]. Chin Chem Lett, 2025, 36(7): 110447.

[41] Jin JM, Wu YP, Zhao Z, et al. Small-molecule PROTAC mediates targeted protein degradation to treat STAT3-dependent epithelial cancer [J]. JCI Insight, 2022, 7(22): e160606.

[42] Trapani J, Caroland KP, Ahmed Y, et al. Targeting β-catenin: PROTACs and precision degraders for Wnt-driven cancers [J]. Front Oncol, 2026, 16: 1777843.

[43] Liao HW, Li X, Zhao LZ, et al. A PROTAC peptide induces durable β-catenin degradation and suppresses Wnt-dependent intestinal cancer [J]. Cell Discov, 2020, 6: 35.

[44] Ringnalda FCAS, van Son GJF, Verweij LHG, et al. Small round cell sarcoma tumoroid biobank reveals *CIC*::*DUX4* sarcoma vulnerability to MCL-1 inhibition [J]. Nat Commun, 2025, 16: 7689.

[45] Magré L, Verstegen MMA, Buschow S, et al. Emerging organoid-immune co-culture models for cancer research: from oncoimmunology to personalized immunotherapies [J]. J Immunother Cancer, 2023, 11(5): e006290.

[46] Li KY, Liu C, Sui XZ, et al. An organoid co-culture model for probing systemic anti-tumor immunity in lung cancer [J]. Cell Stem Cell, 2025, 32(8): 1218-1234.e7.

[47] Haughton PD, Enserink LNFL, Tavares S, et al. FER kinase governs invasive growth of head and neck squamous cell carcinoma through dynamic control of growth factor receptor activity [J]. Neoplasia, 2025, 70: 101241.

[48] Yin LY, Shu PC, Peng XZ. Context matters: E3 ligase-ligand pairing strategies for optimized PROTAC performance [J]. Protein Cell, 2026, 17(5): 384-398.

[49] Riching KM, Mahan SD, Urh M, et al. High-throughput cellular profiling of targeted protein degradation compounds using HiBiT CRISPR cell lines [J]. JoVE, 2020(165): e61787.

（责任编辑　李楠）

生物技术通报
· 技术与方法 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):81-91

CRISPR-Cas反式切割技术在动物病原体多重核酸检测中的应用进展

张津慎[1] 余永涛[2*] 戚姣姣[3] 何海洋[1]
（1.岳阳市动物疫病预防控制中心，岳阳 414000；2.宁夏大学动物科技学院，银川 750021；3.君山区动物卫生监督所，岳阳 414005）

摘 要： 病原体感染呈现多样性和复杂性的趋势，给动物疾病诊断和防治带来了严峻挑战。在病原体多重检测的过程中，传统核酸检测方法如聚合酶链式反应、等温扩增技术和全基因组测序存在操作复杂、成本高昂、依赖专业设备和人员等局限，因而迫切需要一种准确、快捷、便携的病原体多重检测技术。CRISPR-Cas系统是存在于许多原核生物中的适应性免疫系统。而基于CRISPR-Cas的反式切割技术，是一种能精准靶向和切割核酸的新型检测技术，该技术无需专业设备，即可在现场实现amol/L水平的检测。本文通过梳理近5年来CRISPR-Cas系统相关的研究进展，重点对CRISPR-Cas反式切割系统的分类，CRISPR-Cas反式切割技术在动物病原检测中的研究成果和应用现状，以及CRISPR-Cas反式切割系统的信号富集策略进行综述，并进一步阐述CRISPR-Cas技术在动物多重病原检测中的优势和发展前景，以期为进一步发展基于CRISPR-Cas反式切割系统的多重核酸检测技术提供参考。

关键词： CRISPR-Cas技术；动物病原体；多重检测；反式切割活性
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1413

Application Advances of CRISPR-Cas *Trans*-cleavage Technology in Multiplex Nucleic Acid Detection of Animal Pathogens

ZHANG Jin-shen[1] YU Yong-tao[2*] QI Jiao-jiao[3] HE Hai-yang[1]
（1. *Yueyang Animal Disease Prevention and Control Center, Yueyang* 414000; 2. *School of Animal Science and Technology, Ningxia University, Yinchuan* 750021; 3. *Junshan District Animal Health Inspection Institute, Yueyang* 414005）

Abstract: The increasing diversity and complexity of pathogen infections pose a serious challenge to the diagnosis, prevention, and control of animal diseases. Traditional nucleic acid detection methods, such as polymerase chain reaction (PCR), isothermal amplification techniques, and whole-genome sequencing, are limited by complex operation, high cost, and reliance on specialized equipment and personnel. Therefore, there is an urgent need for an accurate, rapid, and portable multiplex pathogen detection technology. The CRISPR-Cas system, an adaptive immune mechanism found in many prokaryotes, has inspired a new generation of detection platforms. The CRISPR-Cas-based *trans*-cleavage technology is a novel detection method that enables precise targeting and cleavage of nucleic acids. This technology allows for on-site detection at the attomolar (amol/L) level without the need for specialized equipment. In this review, we summarize recent advances in CRISPR-Cas systems over the past five years. We focus specifically on the classification of CRISPR-Cas *trans*-cleavage systems, their research achievements and current application status in animal pathogen detection, and the signal amplification strategies employed in these systems. We also discuss the advantages and future prospects of CRISPR-Cas technology for multiplex pathogen detection in animals. This review aims to provide a reference for the further development of multiplex nucleic acid detection technologies based on CRISPR-Cas *trans*-cleavage systems.

Keywords: CRISPR-Cas technology; animal pathogens; multiplex detection; *trans*-cleavage activity

收稿日期：2025-12-24
基金项目：宁夏重点研发计划项目（2024BBF02018）
*通信作者：余永涛 yyt1211@163.com

自2018年6月中国报告首例非洲猪瘟疫情后，该病毒在两年内便蔓延至全国所有省份，导致生猪存栏量减半，猪肉生产遭受重创[1]。1997年到2024年间，全球共24个国家报告了911例人类H5N1感染病例，其中896人确认感染HPAI H5N1，死亡率高达52%[2-3]。截至2021年，口蹄疫对全球畜牧业造成的直接和间接损失高达620亿美元，包括但不限于产奶量减少、牵引力降低、体重减轻、生育能力下降和贸易收入降低[4]。毫无疑问，由病原微生物引起的动物疾病不仅会危害动物健康，降低生产效益，更威胁着人类的生命健康。如何快速、准确地识别病原微生物对动物疫病防控至关重要。

目前，核酸检测技术作为病原分子诊断的常用方法，广泛用于动物疫病诊断和防控。包括基于聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）的传统技术（如常规PCR、多重PCR、纳米PCR、荧光PCR）以及等温扩增技术（isothermal amplification technology, ITA）、核酸杂交（nucleic acid hybridization, NAH）和全基因组测序（whole genome sequencing, WGS）等新型技术。传统PCR受限于检测仪器和专业人员，无法实现现场即时检测（point-of-care testing, POCT）。ITA操作便捷、设备依赖小，但易出现假阳性[5]。NAH具有良好的特异性和高灵敏度，但需要复杂的检测探针[6]。WGS无须预设探针便可获取巨量遗传信息，但存在检测周期长和成本高昂的缺点[7]。为了适应动物疫病防控需求，仍需要开发出一种简单、高效、准确、经济且无设备依赖的现场疾病检测技术，以实现对动物疫病的快速筛查与诊断，为现场防控提供即时依据。

规律间隔成簇短回文重复序列及其关联蛋白系统（clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins, CRISPR-Cas）是许多细菌和古细菌的适应性免疫系统，通过切割、易位和重复等方式编辑外源基因，以抵御病毒和质粒等遗传元件的入侵，现已广泛用于基因工程领域[8-11]。近年来研究表明，部分CRISPR-Cas系统具有反式切割活性，即Cas蛋白-gRNA复合物识别并结合特异性靶序列后，持续表现出对周围所有单链核酸分子的无差别降解活性[12-13]，由此引起的广泛脱靶效应进而降低基因编辑的特异性和保真度。该特性在基因工程中的应用虽受限，却意外地为病原核酸检测领域提供了新的发展路径。合理利用反式切割活性，在反应体系中加入非靶向功能化的报告核酸，当目标核酸存在时，报告核酸也被破坏，从而释放大量可被检测的信号，通过对信号进行可视化处理，最终可实现高灵敏度的靶标检测[14]。基于反式切割基本原理，目前已实现对非洲猪瘟病毒[15]、布鲁氏杆菌[16]、炭疽杆菌[17]等病原体的精确检测。然而，为了追求更高的性能与适用性，当前的研究重点已转向将纳米材料、磁流体芯片引入检测平台，或通过定向改造CRISPR-Cas系统以优化反式切割性能，进而开发高灵敏度、高特异性、便携式的病原体多重检测平台。这些多重检测平台为畜牧兽医病原体检测奠定了坚实基础，将为动物疫病防控与食品安全检测领域的革新提供强大支撑。

1 CRISPR-Cas系统分类和反式切割机制

目前CRISPR-Cas系统的分类等级从大到小依次为类（class）、类型（type）、亚型（subtype）、变体（variant）[18]。根据靶向阶段中效应蛋白是一种Cas蛋白还是多种Cas蛋白组成的复合体，可将CRISPR-Cas系统分成由多种Cas蛋白与crRNA共同形成的第一类系统和由一种Cas蛋白形成的第二类系统。同一类系统中，又可根据靶向阶段中效应蛋白或复合体的不同，分为不同的类型。同一类型系统中还可根据效应蛋白间序列相似性的不同，进一步划分成不同亚型和变种。具有反式切割活性的CRISPR-Cas系统主要来源于第二类的V型（如Cas12）和VI型（如Cas13）。其核心原理是：效应蛋白在与gRNA及特异性靶标结合后，被激活并触发反式切割活性，从而无差别地切割周围带有荧光标记的单链核酸探针，最终产生可检测的信号[19-20]。尽管原理相似，但Cas12与Cas13在结构和切割底物上存在根本区别：Cas12仅含一个RuvC核酸内切酶结构域，它在靶向切割双链DNA后，该结构域会进入持续激活状态，进而非特异性切割单链DNA[21]；而Cas13则拥有两个HEPN结构域，它在靶向识别并切割单链RNA后，其HEPN结构域被激活，能够非特异性地切割周围单链RNA[22]。

随着研究者对CRISPR-Cas系统的深入研究，越

来越多具有反式切割活性的蛋白亚型被发掘出来，并在疾病诊断、微生物检测、生物毒素分析等方面展示出巨大潜力[23-26]。基于这些分类（表1），下文将探讨不同Cas蛋白在病原多重检测中的应用。

表1　具有反式切割活性的Cas蛋白的主要特征

Table 1　Main features of Cas proteins with *trans*-cleavage activity

效应蛋白类型 Effector protein type	基因命名法 Gene nomenclature	分子量大小 Mw（aa）	最佳作用温度 Optimum temperature（℃）	核酸内切酶活性结构域 Endonuclease active domain	引导RNA Guide RNA	靶基因 Target gene	靶基因识别位点 Target gene recognition site	反式切割底物 *Trans*-cleavage substrate	参考文献 References
V型效应蛋白	Cas12a（Cpf1）	1 223	37	RuvC	crRNA	（ds/ss）DNA	PAM	ssDNA	［27-31］
	Cas12b（C2c1）	1 129	48	RuvC	tracrRNA+crRNA	（ds/ss）DNA	PAM	ssDNA	
	Cas12f1（Cas14a）	422	45-55	RuvC	tracrRNA+crRNA	dsDNA	PAM	ssRNA	
VI型效应蛋白	Cas13a（C2c2）	1 250	37	HEPN	crRNA	ssRNA	PFS	ssRNA	［32-34］
	Cas13b	1 150	55	HEPN	crRNA	ssRNA	PFS	ssRNA	

2　CRISPR-Cas反式切割系统在病原多重核酸检测中的应用

得益于多种具有反式切割活性的Cas蛋白亚型，研究者们得以以新视角开发高效、便捷、稳定、特异性强的检测技术用于多重病原诊断。目前，根据反应中体系的数量可将CRISPR-Cas多重核酸检测技术分为多体系检测技术和单体系检测技术。

2.1　多体系的CRISPR-Cas多重核酸检测技术

多体系CRISPR-Cas多重核酸检测技术，核心是将多个CRISPR-Cas反应体系用芯片整合，构建出具有精确操控能力和多重检测能力的技术平台。该平台依靠电磁驱动磁性纳米颗粒引导液滴运动，在系统编程下进行等分、合并和加热等操作，实现对多种病原体核酸靶标的高通量、自动化、高灵敏度与高特异性的同步检测。

Ackerman等[35]基于微流体芯片率先开发了一种用于多重核酸检测的CARMEN平台，将含目的基因的样本溶液与由Cas13蛋白和荧光报告基因构成的检测溶液分别用不同的荧光染料标记，随后在微孔阵列芯片中构建样本液滴和检测液滴的所有潜在偶联形式，并同步启动反应。最后对芯片中产生的荧光图谱进行分析解码，可实现单次实验中近4 500次检测。基于该平台，作者通过构建覆盖甲型流感病毒H1-H16和N1-N9亚型的144种检测组合，对20份临床鼻咽拭子样品进行检测，获得了与高通量测序（next-generation sequencing, NGS）完全一致的结果。由此，检测模式实现了从高优先级样本靶向检测到大样本集综合性筛查的根本性转变。为了进一步简化系统和降低成本，研究者们尝试使用各类微流体芯片来构建新检测平台。例如：以商用集成流体电路芯片（integrated fluidic circuit, IFC）开发的mCARMEN平台，在保留CARMEN高敏感性和大样本检测能力的同时，消除了对颜色编码和液滴化的需求，并大幅缩减了检测时间[36]。依靠这些改进，mCARMEN平台成功实现了对6种新冠病毒（SARS-CoV-2）变体的鉴别诊断，在101个已知SARS-CoV-2阳性患者样本中，98份检测结果与NGS检测结果一致，正确率为97.03%。而MiCaR平台使用具有辐射状加样通道的星爆型芯片（starburst-shaped microchip, SS-Chip），通过物理隔离反应腔室，可实现流感病毒和SARS-CoV-2等呼吸道病原的多重检测[37]。经多重重组酶聚合酶扩增（recombinase polymerase amplification, RPA）验证，30份目标病毒均被MiCaR平台准确识别。虽然MiCaR平台的单次检测量不及CARMEN与mCARMEN平台，但得益于SS-Chip的低成本及无需颜色编码等优势，在POCT中展现出巨大潜力。不同于颜色编码、高性能芯片编程和物理隔离的方式，Roh等[38]另辟蹊

径将微流体芯片与水凝胶微粒（hydrogel microparticles, HMP）结合，建立了CLAMP平台。借助HMP的空间编码与信号隔离能力，可在具备类似溶液扩散能力的同时，避免样品发生交叉干扰，最终实现人乳头瘤病毒（human papillomavirus, HPV）亚型的高精度多重检测。经CaSki、HeLa、SiHa和C33A标准细胞模型验证，CLAMP平台的检测正确率为100%。

从技术演进脉络看，mCARMEN和MiCaR平台以CARMEN平台为基础，通过削减颜色编码需求或采用低成本物理分区来降低芯片成本；而CLAMP平台将磁流体芯片和HMP创新性结合，实现了检测通量与检测精度间的最优平衡。尽管上述平台在性能验证阶段表现不俗，但其发展仍面临若干共性挑战。首先，平台性能高度依赖于精密磁流体芯片、高分辨率信号解码模块及精准磁场调控系统的协同运作，这显著提高了设备制造成本与维护门槛，难以广泛推广。其次，在液滴驱动过程中，磁性纳米颗粒和液滴间的运动响应差异会在芯片通道内引发残留或卫星液滴，进而影响定量精度。除此之外，电磁场对并行液滴的独立操控能力存在上限，制约了检测通量的进一步提升。由此可见，该技术从原理验证走向广泛应用，仍有较长距离。

2.2 单体系的CRISPR-Cas多重核酸检测技术

单体系CRISPR-Cas多重核酸检测技术，核心是将多个不同类别的Cas蛋白整合到同一反应体系中，构建基因多重检测平台。该平台依靠不同Cas酶对原始间隔区相邻基序（protospacer adjacent motif, PAM）特异性识别的差异和对报告基因的反式切割活性的区别，实现对多种病原体核酸靶标的高兼容性、高灵敏性与高特异性的同步检测。

Gootenberg等[39]曾使用VI型效应蛋白中的不同亚型建立SHERLOCKv2平台，期望通过不同亚型对碱基的切割偏好实现四重核酸检测。但由于Cas13a和Cas13b蛋白的反式切割底物均为ssRNA，当检测两个浓度不同的目标时，可能因信号渗漏导致检测结果混淆。为解决信号串扰风险，研究者们根据Cas12a和Cas13a蛋白对反式切割底物的偏好，建立了Cas12a/Cas13a正交检测系统。目前，该系统已成功应用于多项研究，如Tian等[40]实现了非洲猪瘟衣壳蛋白基因（ASFV p72）和β-actin基因（ACTB）的双重检测；Zhu等[41]实现了重症发热伴血小板减少综合征中L基因和M基因的双重检测；Zheng等[42]则实现了HPV16/18的双重检测。经临床样本验证，上述应用中，Cas12a/Cas13a正交检测系统与PCR相比，阳性预测一致性为100%，阴性预测一致性均高于96.55%，虽然阴性预测一致性未达100%，但仍可证明Cas12a/Cas13a正交检测系统的良好特异性。值得注意的是，近期文献指出Cas12系统拥有非典型反式切割活性，即涵盖DNA和RNA靶激活的反式DNase和反式RNase活性，挑战了它仅被视为具有DNA靶标激活的反式DNase活性的传统观点[43-46]。这一新特点被认为是导致CRISPR-Cas多重检测系统特异性降低及出现假阳性结果的内在原因。而Cas12a/Cas13a正交检测系统的阴性预测一致性未达100%，亦可能与这一非典型特征有关。针对Cas12系统的非典型特征，研究者们采用了不同的方法来消除其潜在影响。例如：Ghouneimy等[47]通过灵活调整Cas蛋白和靶标的搭配顺序，成功实现了单管内HPV16、HPV18和阳性内参基因（RNase P）的三重检测。Wu等[48]则使用基因编辑技术构建Cas12f1的RNase失活变体（Cas12f1/K173A突变体，称为drCas12f1），将drCas12f1与Cas13a蛋白整合，最终开发出同时检测甲型流感病毒亚型H1N1和核糖核酸酶P蛋白基因POP7的双靶点检测系统，拥有100%的灵敏度和特异性。

多体系和单体系CRISPR-Cas多重核酸检测技术，作为以反式切割为主要原理的多重核酸检测技术，具有各自的优势和局限性。多体系CRISPR-Cas多重核酸检测技术的最大优势在于自动化和高通量，可轻松实现大样本集的综合检测，却存在设备昂贵、检测周期长的缺点。相比之下，单体系CRISPR-Cas多重核酸检测技术具有体系精简、设备依赖性低等特点，可以灵活部署于常规实验室环境。但是该技术的发展同样面临瓶颈，一方面，受限于Cas蛋白的种类和Cas12的非典型反式切割活性，检测通量通常为2–3重且难以构建独立的正交体系；另一方面，不同Cas蛋白的最适反应条件存在差异，单管反应中需要对缓冲体系作出妥协，无可避免地牺牲掉部分Cas酶的切割效率。因此，单体系技术虽在

便捷性与可及性上占优，但其通量扩展与信号正交性仍是制约应用深度的核心瓶颈。

3　CRISPR-Cas系统在多重核酸检测中的信号富集策略

DETECTOR[49]、SHERLOCK[50]和HOLMES[51]等传统CRISPR-Cas核酸检测系统为保证高特异性和灵敏度，通常需要分开两步进行，即先扩增目的基因，再进行检测。但多步骤操作会使实验复杂性增加、反应时间延长和交叉污染风险升高[52-53]。为实现更高的检测灵敏度，关键在于富集检测中的荧光信号。研究者们基于一锅法CRISPR-Cas核酸检测的不同反应阶段，开发了不同的信号放大方法，并取得了显著成效。

3.1　扩增目的基因以增强荧光信号

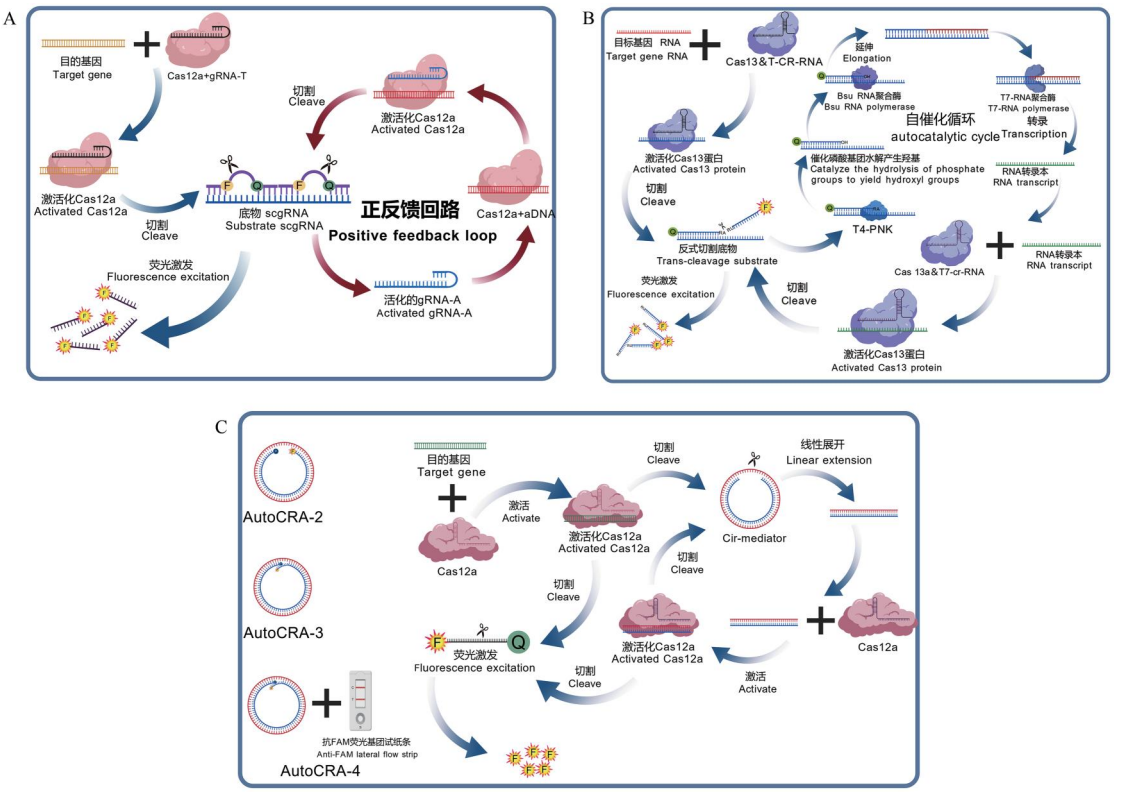
一锅反应中，CRISPR-Cas检测和等温扩增会相互竞争，影响最终信号强度。其中顺式切割效率是决定一锅反应性能的关键因素[54-55]。针对“如何调控顺式切割效率以优化一锅法检测性能”这一核心问题，学者从两个维度开展研究并提出了相应策略：一是通过调控Cas蛋白与底物的结合效率来实现全局反应平衡；二是根据不同Cas蛋白的机制差异，采用针对性策略以规避对扩增的干扰。在实现全局平衡方面，“次优PAM”是一种有效的动力学调控策略。Lu等[56]研究指出，次优PAM介导的顺式切割反应可实现一锅反应中基因扩增和顺式切割的平衡，避免因使用经典PAMs导致底物消耗过多和扩增子积累缓慢。实验证明，次优PAM介导的一锅法检测灵敏度高于经典PAM，检测限（limit of detection, LOD）为1 cp/μL，与qPCR相当。这一策略的普适性和优势同样得到了Zheng等[57]验证，他们观察到在次优PAM介导的CRISPR检测中，扩增子会在5–10 min内逐渐积累，累积速度与丰度均高于常规PAM体系。作者用此方法成功检测链球菌DNA，并具有高度的准确性和特异性。在不同Cas系统的干扰应对策略方面，Tong团队[58]通过构建PAM结构域突变体Cas12b-2M（G478A/K396A位点双重突变的AapCas12b），可以减少Cas12b系统的扩增抑制效应。而对Cas13系统，作者重新设计检测路径，借助逆转录、反向引物扩增和转录等操作得到与病毒RNA逆互补的RNA，再以逆互补RNA为监测靶标，最终杜绝了Cas13a对原始模板的干扰。

3.2　构建级联放大反应以增强荧光信号

构建级联放大反应的核心在于对反应路径进行合理设计，构建一个多步、有序且自驱动的反应循环[59]。CONAN自催化核酸回路（图1-A）便是基于这一理念的产物，当靶标DNA激活首个Cas12a蛋白后，会切割多功能scgRNA，产生信号并释放出gRNA；随后gRNA激活第二个Cas12a蛋白，形成自供给的循环放大，最终实现信号指数增长[60]。遵循相似的自驱动设计逻辑，He等[61]建立了CRISPR-Cas13a自催化系统（图1-B），Cas13a&T-crRNA RNP被靶RNA初次激活后，切割报告基因。经T4 PNK与Bsu聚合酶修复并延伸残留报告基因，生成带T7启动子的双链DNA。T7 RNA聚合酶可基于延伸的残留报告基因转录出大量次级RNA。所得RNA转录本可与Cas13a-T7-crRNA RNP结合，继续激活反式切割活性，并最终实现荧光信号的高效放大。Deng团队[62]则建立了自催化Cas12a循环DNA扩增系统（autocatalytic cas12a-mediated autonomous replication, AutoCAR）（图1-C）。AutoCAR使用小环状DNA纳米结构（称为Cir-mediator）作为关键底物，当Cir-mediator被靶基因活化的Cas12a反式切割后发生拓扑结构变化，变成线性形状；线性形状的Cir-mediator又可以激活未活化的Cas12a蛋白，产生反式切割作用，逐级放大荧光信号。不仅如此，作者通过改变荧光基团的位置和改进Cir-mediator的环状结构，建立了3种自催化传感器方案（AutoCAR-2、AutoCAR-3、AutoCAR-4），其中AutoCAR-2、AutoCAR-3适用于病原体定量检测，AutoCAR-4适用于病原体定性检测。这3种方案均可实现室温下对单个拷贝核酸进行无扩增的超灵敏检测。

3.3　改造反式切割底物以增强荧光信号

反式切割的底物性能是CRISPR-Cas多重核酸检测系统的关键，直接决定了最终荧光信号的水平。为此，研究者们采用优化信号相对强度和增强信号绝对强度两种策略对反式切割底物进行改造，以提升信号输出性能。在优化信号相对强度方面，核心是依靠具有高效淬灭能力的纳米材料，通过荧光共振能量转移效应（förster reson ance energy transfer, FRET）显著淬灭信号，降低检测背景并凸显目标信



A:CONAN 自催化核酸回路原理图;B:CRISPR-Cas13a 自催化系统原理图;C:AutoCAR 原理图。该图使用 BioGDP.com 生成,下同

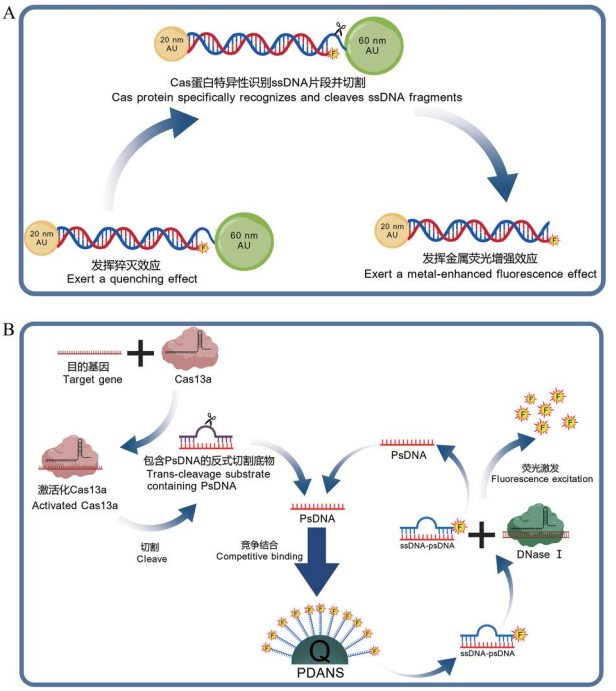
A: Schematic diagram of the CONAN autocatalytic nucleic acid circuit. B: Schematic diagram of the CRISPR-Cas13a autocatalytic system. C: Schematic diagram of AutoCAR. The figure was created with BioGDP.com, the same below

图 1 基于 CRISPR-Cas 系统的自催化级联放大原理图

Fig. 1 Schematic diagram of the autocatalytic cascade amplification based on the CRISPR-Cas system

号[63-64]。例如：Choi 等[65]利用金纳米颗粒（Au nano-particles, AuNPs）的固有特性，向荧光报告基因引入两个不同大小的 AuNPs，大颗粒发挥强荧光淬灭效应，而小颗粒则发挥金属增强荧光效应，从而在不依赖核酸扩增的条件下实现了 fM 级检测灵敏度（图 2-A）。Cheng 等[66]发现，氧化石墨烯（graphene oxide, GO）特殊的形态结构可以避免空间位阻的影响，进而获得比 AuNPs 更高的荧光信号和更低的初始背景。此外，Huang 团队[67]以聚多巴胺纳米球（polydopamine nanospheres, PDANS）作为淬灭基团构建了 CRISPR 报告系统（图 2-B）。该系统使用 psDNA 作为可再生的信号转导介质，在循环中竞争性结合被 PDANS 淬灭的 FAM 探针，以获得最高的信号/背景对比度。然而，基于纳米材料优化信号相对强度的策略，其信号放大能力存在固有理论上限。为进一步突破检测灵敏度的极限，研究者将策略重心转移至构建一对多的信号输出模式，以增强信号的绝对强度。Guo 团队[68]基于聚集诱导发光源（aggregation-induced emission luminogen, AIEgen），通过将大量阳离子 AIEgens 嵌入 dsDNA 凹槽，并在 dsDNA 两端用 ssDNA/ssRNA 桥接黑洞淬灭基团（black hole quencher, BHQ），最终构建了一种新型的反式切割报告探针——CrisprAIE 报告基因（Q-dsDNA/AIEgens-Q）。该探针经 Cas 蛋白反式切割后，可触发 AIEgens 聚集，发射出远超传统 FQ 探针的强烈荧光。

综上，扩增目的基因、构建级联放大反应和改造反式切割底物这 3 种方法在基本原理和应用途径上各有侧重。为清晰展现各自核心特性，现将 3 种方法归纳如下（表 2）。



A：基于AuNPs实现荧光信号增强的原理；B：基于PDNAS的CRISPR报告系统原理

A: Principle of fluorescence signal enhancement based on AuNPs. B: Principle of the CRISPR reporting system based on PDNAS

图2　利用纳米材料FRET效应优化信号相对强度的原理图

Fig. 2　Schematic diagram of optimizing relative signal intensity using the FRET effect of nanomaterials

4　总结与展望

CRISPR-Cas系统下的各类分支，因靶标和反式切割活性的差异，在病原微生物[69]、病毒[70]和寄生虫[71]疾病诊断中发挥出不可替代的作用。目前，以CRISPR-Cas反式切割系统为核心单独进行的病原诊断技术已得到广泛应用，该技术不仅具有PCR的高准确度和灵敏度，还保留了环介导等温扩增（loop-mediated isothermal amplification, LAMP）的低设备依赖性，更展现出与磁流体芯片、纳米材料等前沿技术的高兼容性。基于荧光[72]、颜色[73]、电化学[74]和距离[75-76]等多种信号输出途径，CRISPR-Cas反式切割系统可灵活适用于各类检测环境的POCT[77-79]，且能根据检测需求在定性和定量中自由切换，是病原早期诊断的重大突破。随着对CRISPR-Cas反式切割系统的深入研究，基于同一系统不同原理的多重病原检测方法被逐渐开发，部分甚至已用于兽医临床诊断。毫无疑问，CRISPR-Cas反式切割技术在未来将成为早期多重疾病诊断工具的新里程碑。

但作为一种新型的检测方法，CRISPR-Cas多重核酸检测技术仍存在一定局限[80-84]。例如：（1）单体系与多体系CRISPR-Cas多重核酸检测技术路线各有优劣：前者简便灵活但通量受限，后者高通量却成本高昂。这些特点使一套技术方案难以同时兼顾基层检测的低成本要求和中心化检测的高通量压力。（2）CRISPR-Cas系统对PAM与PFS位点的依赖会使单核苷酸多态（single nucleotide polymorphism, SNP）和短序列分析受限，无法满足监测动物病原体的变异、区分疫苗和野生病毒等诊断要求。（3）CRISPR-Cas多重检测体系组分多样、反应条件兼容性要求较高，加之冻干保存与常温运输工艺尚未成熟，这些因素共同制约了商品化试剂盒的研发与稳定供应。（4）在未经核酸纯化的现场检测中，CRISPR-Cas体系对复杂样本基质的耐受性相对有限，会影响实际

表2　不同信号富集方法的特性对比

Table 2　Comparison of characteristics of different signal enrichment methods

特性 Characteristics	扩增目的基因 Target gene amplification	构建级联放大反应 Cascade amplification system	改造反式切割底物 Engineering of *trans*-cleavage substrate
基本原理	通过复制实现靶基因数量增加	通过一系列串联反应，实现信号逐级放大	通过设计新型底物，实现高强度信号释放
操作便捷性	高	高	高
设备依赖性	较高	较低	低
灵敏度	极高	极高	高
检测限	aM	aM	fM
成本	高	较高	中
优点	灵敏度高，技术成熟	操作简单且有较高灵敏度	操作简单
局限性	需要精确的温度控制	体系设计难度大	易受样品杂质干扰，影响实验的准确性

应用的稳定性。（5）当前研究多基于人类病原体模型构建，针对畜牧兽医领域关键病原体的多重检测平台仍缺乏大规模验证数据支撑，技术转化进程相对滞后。

针对CRISPR-Cas多重核酸检测系统的局限性，未来可以通过优化Cas蛋白结构或开发新的正交Cas蛋白对，来适应多种复杂场景的检测需求并提升检测通量；也可将人工智能与微流体芯片结合，通过AI算法实时分析复杂信号，以深度挖掘检测信息；还可建立无序列依赖的CRISPR-Cas多重核酸检测系统以满足单碱基突变检测的要求；亦可将检测试剂预混冻干并添加保护剂，实现常温试剂的稳定保存。与此同时，可以逐步将研究重心向畜牧兽医领域倾斜，在养殖场和屠宰场等一线场景中，以PCR金标准方法为对照，系统验证CRISPR-Cas多重检测系统在各类临床样本中的实际性能，为后续的诊断应用积累关键数据。

总之，CRISPR-Cas多重核酸检测技术已在原理层面验证了其在动物疫病诊断中的独特价值，但尚不具备在临床检测中大规模推广的条件。该技术的未来定位并非颠覆现有PCR体系，而是在特定场景中发挥不可替代的补充作用。随着上述瓶颈的逐步消解，CRISPR-Cas多重检测平台有望在新一代动物病原分子诊断工具中占据重要位置。

参考文献

[1] Penrith ML. Current status of African swine fever [J]. CABI Agric Biosci, 2020: 11.

[2] Wang Q, Sun YX, Li ZJ, et al. Are we prepared for the next pandemic: Monitor on increasing human and animal H5N1 avian influenza infection [J]. Chin Med J, 2024, 137(23): 2776-2781.

[3] Simancas-Racines A, Reytor-González C, Toral M, et al. H5N1 avian influenza: a narrative review of scientific advances and global policy challenges [J]. Viruses, 2025, 17(7): 927.

[4] Bayang HN, Mouiche Mouliom MM, Mpouam SE, et al. Evaluation of direct economic losses due to foot and mouth disease reported by the epidemiological surveillance system in Cameroon from 2009 to 2023 [J]. Vet Med Sci, 2025, 11(6): e70681.

[5] 张亚男, 许建成. 分子诊断即时检验的研究进展 [J]. 检验医学与临床, 2025, 22(20): 2875-2880.
Zhang YN, Xu JC. Research progress of point-of-care testing in molecular diagnostics [J]. Lab Med Clin, 2025, 22(20): 2875-2880.

[6] 张羽, 马爱进, 高利芬, 等. 微生物资源分子鉴定技术的研究进展 [J]. 中国工程科学, 2021, 23(5): 86-93.
Zhang Y, Ma AJ, Gao LF, et al. Research progress in molecular identification technology for microbial resources [J]. Strateg Study CAE, 2021, 23(5): 86-93.

[7] 王玉静, 陆梓涔, 陈俊煜, 等. 高通量测序技术的发展及其在临床检测中的应用 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2021, 60(5): 811-820.
Wang YJ, Lu ZC, Chen JY, et al. Development of the high-throughput sequencing technology and its application in clinical detection [J]. J Xiamen Univ Nat Sci, 2021, 60(5): 811-820.

[8] 王晓艳, 秦朗, 马琳莎, 等. CRISPR/Cas系统在核酸检测中的研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学, 2025, 44(7): 647-667, 785.
Wang XY, Qin L, Ma LS, et al. Recent advances in CRISPR/cas-based nucleic acid detection [J]. Genom Appl Biol, 2025, 44(7): 647-667, 785.

[9] Zhou ZW, Cho IH, Kadam US. CRISPR-Cas-based diagnostics in biomedicine: principles, applications, and future trajectories [J]. Biosensors, 2025, 15(10): 660.

[10] Yuan Z. From origin to the present: establishment, mechanism, evolutions and biomedical applications of the CRISPR/Cas-based macromolecular system in brief [J]. Molecules, 2025, 30(4): 947.

[11] Chen LJ, Li J, Chen J, et al. Advances in CRISPR-based gene editing technology and its application in nucleic acid detection [J]. Biocell, 2025, 49(1): 21-43.

[12] Kun D, Qinlong Z, Mingjun J, et al. CRISPR/Cas12a-based biosensing: advances in mechanisms and applications for nucleic acid detection [J]. Biosensors, 2025, 15(6): 360.

[13] Shihong Gao D, Zhu XD, Lu BF. Development and application of sensitive, specific, and rapid CRISPR-Cas13-based diagnosis [J]. J Med Virol, 2021, 93(7): 4198-4204.

[14] Xianglin X, Jing S, Haoran C, et al. Recent advances in clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins system-based biosensors [J]. Biosensors, 2025, 15(3): 155.

[15] Wang XY, He S, Zhao N, et al. Development and clinical application of a novel CRISPR-Cas12a based assay for the detection of African swine fever virus [J]. BMC Microbiol, 2020, 20: 282.

[16] Liu HW, Xu L, Xiu Y, et al. A CRISPR/Cas13a-assisted precise and portable test for *Brucella* nucleic acid detection [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2025, 15: 1545953.

[17] Fan J, Huang LY, Chen JH, et al. Highly sensitive field detection technology for *Anthrax* based on the CRISPR/Cas13a system [J]. Microb Biotechnol, 2025, 18(11): e70240.

[18] 李百涛, 郑越. CRISPR-Cas核酸酶家族的系统分类及挖掘方法研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学, 2025, 44(7): 668-682.
Li BT, Zheng Y. Recent advances in classification and methodology of mining CRISPR-Cas nuclease family [J]. Genom Appl Biol,

2025, 44(7): 668-682.

[19] 艾力非热·艾尼瓦尔, 宁雅婷, 徐英春, 等. 基于CRISPR/Cas系统的病原体核酸检测技术研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2025, 46(19): 2408-2414, 2420.
Ailifeire·ANWE, Ning YT, Xu YC, et al. Research progress in pathogen nucleic acid detection technology based on the CRISPR/Cas system [J]. Int J Lab Med, 2025, 46(19): 2408-2414, 2420.

[20] 戴永进, 孙静, 张莫然, 等. 反式切割CRISPR/Cas技术在食源致病微生物检测方面的原理及应用 [J]. 食品科学, 2024, 45(22): 351-360.
Dai YJ, Sun J, Zhang MR, et al. Principle and application of trans-cleavage CRISPR/cas technology for the detection of foodborne pathogenic microorganisms [J]. Food Sci, 2024, 45(22): 351-360.

[21] Xiao R. Structural and functional studies of type V CRISPR-Cas effectors [D]. West Lafayette: Purdue University, 2024.

[22] Yang H, Patel DJ. Structures, mechanisms and applications of RNA-centric CRISPR-Cas13 [J]. Nat Chem Biol, 2024, 20(6): 673-688.

[23] Chen SJ, Rai CI, Wang SC, et al. Point-of-care testing for infectious diseases based on class 2 CRISPR/Cas technology [J]. Diagnostics, 2023, 13(13): 2255.

[24] 赵振兴, 范奇璇, 王思元, 等. 辣椒轻斑驳病毒RT-RAA-CRISPR/Cas12a可视化检测方法的建立 [J]. 河南农业科学, 2024, 53(9): 80-87.
Zhao ZX, Fan QX, Wang SY, et al. Establishment of RT-RAA-CRISPR/Cas12a based visual detection method for pepper mild mottle virus [J]. J Henan Agric Sci, 2024, 53(9): 80-87.

[25] 何逸昕. 基于CRISPR/Cas12a的生物传感器检测大米中重金属砷的研究 [D]. 武汉: 湖北大学, 2024.
He YX. "aptamer-locker" DNA coupling with CRISPR/Cas12a-guided biosensing for the heavy metal arsenic in rice analysis [D]. Wuhan: Hubei University, 2024.

[26] 乐翔云, 冯之航, 樊彦莉, 等. 基于RAA-CRISPR/Cas13a的禽流感病毒检测方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2024, 44(10): 2153-2158, 2171.
Le XY, Feng ZH, Fan YL, et al. Detection of avian influenza virus by RAA-CRISPR/Cas13a [J]. Chin J Vet Sci, 2024, 44(10): 2153-2158, 2171.

[27] Xie SL, Yue YH, Yang F. Recent advances in CRISPR/Cas system-based biosensors for the detection of foodborne pathogenic microorganisms [J]. Micromachines, 2024, 15(11): 1329.

[28] Yang YH, Wang DD, Lü P, et al. Research progress on nucleic acid detection and genome editing of CRISPR/Cas12 system [J]. Mol Biol Rep, 2023, 50(4): 3723-3738.

[29] Wu WY, Adiego-Pérez B, van der Oost J. Biology and applications of CRISPR-Cas12 and transposon-associated homologs [J]. Nat Biotechnol, 2024, 42(12): 1807-1821.

[30] Xuan QB, Wang JJ, Nie YQ, et al. Research progress and application of miniature CRISPR-Cas12 system in gene editing [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(23): 12686.

[31] Gunitseva N, Evteeva M, Korzhenkov A, et al. A new RNA-dependent Cas12g nuclease [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(23): 17105.

[32] Perčulija V, Lin JY, Zhang B, et al. Functional features and current applications of the RNA-targeting type VI CRISPR-Cas systems [J]. Adv Sci, 2021, 8(13): 2004685.

[33] Kavuri NR, Ramasamy M, Qi YP, et al. Applications of CRISPR/Cas13-Based RNA Editing in Plants [J]. Cells. 2022, 11(17): 2665.

[34] Shi PG, Wu XB. Programmable RNA targeting with CRISPR-Cas13 [J]. RNA Biol, 2024, 21(1): 575-583.

[35] Ackerman CM, Myhrvold C, Thakku SG, et al. Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13 [J]. Nature, 2020, 582(7811): 277-282.

[36] Welch NL, Zhu ML, Hua C, et al. Multiplexed CRISPR-based microfluidic platform for clinical testing of respiratory viruses and identification of SARS-CoV-2 variants [J]. Nat Med, 2022, 28(5): 1083-1094.

[37] Xu ZC, Chen DJ, Li T, et al. Microfluidic space coding for multiplexed nucleic acid detection via CRISPR-Cas12a and recombinase polymerase amplification [J]. Nat Commun, 2022, 13: 6480.

[38] Roh YH, Lee CY, Lee S, et al. CRISPR-enhanced hydrogel microparticles for multiplexed detection of nucleic acids [J]. Adv Sci, 2023, 10(10): 2206872.

[39] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6 [J]. Science, 2018, 360(6387): 439-444.

[40] Tian T, Qiu ZQ, Jiang YZ, et al. Exploiting the orthogonal CRISPR-Cas12a/Cas13a trans-cleavage for dual-gene virus detection using a handheld device [J]. Biosens Bioelectron, 2022, 196: 113701.

[41] Zhu YT, Xing C, Yang L, et al. Dual-gene detection in a single-tube system based on CRISPR-Cas12a/Cas13a for severe fever thrombocytopenia syndrome virus [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 977382.

[42] Zheng X, Li YK, Yuan MZ, et al. Rapid detection of HPV16/18 based on a CRISPR-Cas13a/Cas12a dual-channel system [J]. Anal Methods, 2022, 14(48): 5065-5075.

[43] Rananaware SR, Vesco EK, Shoemaker GM, et al. Programmable RNA detection with CRISPR-Cas12a [J]. Nat Commun, 2023, 14: 5409.

[44] Li JC, Luo T, He Y, et al. Discovery of the Rnase activity of CRISPR-Cas12a and its distinguishing cleavage efficiency on various substrates [J]. Chem Commun, 2022, 58(15): 2540-2543.

[45] Nguyen LT, Macaluso NC, Rakestraw NR, et al. Harnessing noncanonical crRNAs to improve functionality of Cas12a orthologs

[J]. Cell Rep, 2024, 43(2): 113777.

[46] Zhang JY, Li ZY, Guo C, et al. Intrinsic RNA targeting triggers indiscriminate DNase activity of CRISPR-Cas12a [J]. Angew Chem Int Ed, 2024, 63(20): e202403123.

[47] Ghouneimy A, Ali Z, Aman R, et al. CRISPR-based multiplex detection of human papillomaviruses for one-pot point-of-care diagnostics [J]. ACS Synth Biol, 2024, 13(3): 837-850.

[48] Wu Q, Yi ZF, Li HR, et al. Harnessing noncanonical trans-cleavage characteristics of Cas12 and Cas13a to enhance CRISPR-based diagnostics [J]. Commun Biol, 2024, 7: 1312.

[49] Chen JS, Ma EB, Harrington LB, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity [J]. Science, 2018, 360(6387): 436-439.

[50] Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, et al. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases [J]. Nat Protoc, 2019, 14 (10): 2986-3012.

[51] Li SY, Cheng QX, Wang JM, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection [J]. Cell Discov, 2018, 4: 20.

[52] Broughton JP, Deng XD, Yu GX, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2 [J]. Nat Biotechnol, 2020, 38(7): 870-874.

[53] Patchsung M, Jantarug K, Pattama A, et al. Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA [J]. Nat Biomed Eng, 2020, 4(12): 1140-1149.

[54] Shao FC, Park JS, Zhao GJ, et al. Elucidating the role of CRISPR/Cas in single-step isothermal nucleic acid amplification testing assays [J]. Anal Chem, 2023, 95(7): 3873-3882.

[55] Liu HY, Yin H, Xiu LS, et al. One-pot isothermal nucleic acid amplification assisted CRISPR/Cas detection technology: challenges, strategies, and perspectives [J]. Adv Sci, 2025, 12(37): e06716.

[56] Lu SH, Tong XH, Han Y, et al. Fast and sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA using suboptimal protospacer adjacent motifs for Cas12a [J]. Nat Biomed Eng, 2022, 6(3): 286-297.

[57] Zheng WG, Tang HM, Ye BC, et al. Fast, portable and sensitive detection of group B *Streptococcus* DNA using one-pot *MIRA*-CRISPR system with suboptimal PAM [J]. Talanta, 2024, 279: 126574.

[58] Tong XH, Zhang K, Han Y, et al. Fast and sensitive CRISPR detection by minimized interference of target amplification [J]. Nat Chem Biol, 2024, 20(7): 885-893.

[59] Jiang H, Li Y, Lv XF, et al. Recent advances in cascade isothermal amplification techniques for ultra-sensitive nucleic acid detection [J]. Talanta, 2023, 260: 124645.

[60] Shi K, Xie SY, Tian RY, et al. A CRISPR-Cas autocatalysis-driven feedback amplification network for supersensitive DNA diagnostics [J]. Sci Adv, 2021, 7(5): eabc7802.

[61] He YG, Du K, Liu ZH, et al. One-tube target amplification-free CRISPR-Cas13 autocatalytic system [J]. Microchem J, 2024, 206: 111498.

[62] Deng F, Li Y, Yang BY, et al. Topological barrier to Cas12a activation by circular DNA nanostructures facilitates autocatalysis and transforms DNA/RNA sensing [J]. Nat Commun, 2024, 15: 1818.

[63] Arshad F, Yee BJ, Ting KP, et al. Nanomaterials as signal amplifiers in CRISPR/Cas biosensors: a path toward multiplex point-of-care diagnostics [J]. Microchem J, 2024, 207: 111826.

[64] Huang D, Xu CT, Jiang CH, et al. Advances and challenges of signal readout systems in CRISPR-based biosensors for point-of-care testing of nucleic acid [J]. Trac Trends Anal Chem, 2024, 178: 117856.

[65] Choi JH, Lim J, Shin M, et al. CRISPR-Cas12a-based nucleic acid amplification-free DNA biosensor via Au nanoparticle-assisted metal-enhanced fluorescence and colorimetric analysis [J]. Nano Lett, 2021, 21(1): 693-699.

[66] Cheng XX, Yan YR, Chen XP, et al. CRISPR/Cas12a-Modulated fluorescence resonance energy transfer with nanomaterials for nucleic acid sensing [J]. Sens Actuat B Chem, 2021, 331: 129458.

[67] Huang D, Shen PJ, Xu CT, et al. Dual nucleases-assisted cyclic amplification using polydopamine nanospheres-based biosensors for one-pot detection of microRNAs [J]. Biosens Bioelectron, 2023, 222: 114957.

[68] Guo YQ, Zhou YF, Duan H, et al. CRISPR/Cas-mediated "one to more" lighting-up nucleic acid detection using aggregation-induced emission luminogens [J]. Nat Commun, 2024, 15: 8560.

[69] Yang YJ, Kong XX, Yang JL, et al. Rapid nucleic acid detection of *Listeria monocytogenes* based on RAA-CRISPR Cas12a system [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(6): 3477.

[70] Wei J, Li YN, Cao YL, et al. Rapid and visual detection of porcine parvovirus using an ERA-CRISPR/Cas12a system combined with lateral flow dipstick assay [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 879887.

[71] Wang XF, Cheng M, Yang SQ, et al. CRISPR/Cas12a combined with RPA for detection of T. gondii in mouse whole blood [J]. Parasites Vectors, 2023, 16: 256.

[72] Smith CW, Kachwala MJ, Nandu N, et al. Recognition of DNA target formulations by CRISPR-Cas12a using a dsDNA reporter [J]. ACS Synth Biol, 2021, 10(7): 1785-1791.

[73] Zhang WS, Pan JB, Li F, et al. Reverse transcription recombinase polymerase amplification coupled with CRISPR-Cas12a for facile and highly sensitive colorimetric SARS-CoV-2 detection [J]. Anal Chem, 2021, 93(8): 4126-4133.

[74] Zhang DC, Yan YR, Que HY, et al. CRISPR/Cas12a-mediated interfacial cleaving of hairpin DNA reporter for electrochemical nucleic acid sensing [J]. ACS Sens, 2020, 5(2): 557-562.

[75] Huang D, Ni DS, Fang MJ, et al. Microfluidic ruler-readout and CRISPR Cas12a-responded hydrogel-integrated paper-based

analytical devices (μReaCH-PAD) for visible quantitative point-of-care testing of invasive fungi [J]. Anal Chem, 2021, 93(50): 16965-16973.

[76] Feng SQ, Chen HJ, Hu ZA, et al. Ultrasensitive detection of miRNA via CRISPR/Cas12a coupled with strand displacement amplification reaction [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2023, 15(24): 28933-28940.

[77] Ghouneimy A, Mahas A, Marsic T, et al. CRISPR-based diagnostics: challenges and potential solutions toward point-of-care applications [J]. ACS Synth Biol, 2023, 12(1): 1-16.

[78] Wang XJ, Shang XY, Huang XX. Next-generation pathogen diagnosis with CRISPR/Cas-based detection methods [J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1): 1682-1691.

[79] Son H. Harnessing CRISPR/cas systems for DNA and RNA detection: principles, techniques, and challenges [J]. Biosensors, 2024, 14(10): 460.

[80] Kaur R, Gupta S, Chauhan A, et al. Harnessing the power of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) based microfluidics for next-generation molecular diagnostics [J]. Mol Biol Rep, 2024, 51: 896.

[81] Mumtaz Z, Rashid Z, Ali A, et al. Prospects of microfluidic technology in nucleic acid detection approaches [J]. Biosensors, 2023, 13(6): 584.

[82] de Puig H, Lee RA, Najjar D, et al. Minimally instrumented SHERLOCK (miSHERLOCK) for CRISPR-based point-of-care diagnosis of SARS-CoV-2 and emerging variants [J]. Sci Adv, 2021, 7(32): eabh2944.

[83] Chandrasekaran SS, Agrawal S, Fanton A, et al. Rapid detection of SARS-CoV-2 RNA in saliva via Cas13 [J]. Nat Biomed Eng, 2022, 6(8): 944-956.

[84] Huang Z, Lyon CJ, Wang J, et al. CRISPR assays for disease diagnosis: progress to and barriers remaining for clinical applications [J]. Adv Sci, 2023, 10(20): 2301697.

（责任编辑　朱琳峰）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):92-102

OsTrxL1与OsCYP89A2互作协同调控水稻干旱胁迫响应

钟娇 任琼 范照睿 段玉 秦童* 康振辉*
（四川轻化工大学食品与酿酒工程学院，宜宾 644005）

摘 要： 【目的】解析水稻硫氧还蛋白样蛋白基因*OsTrxL1*在干旱胁迫响应中的生物学功能及其潜在的分子调控机制，为深入理解水稻非生物胁迫应答提供理论依据。【方法】采用CRISPR/Cas9基因编辑技术和转基因技术分别获得敲除和过表达株系，通过测定水稻干旱胁迫下的生理指标解析*OsTrxL1*的生物学功能，结合亚细胞定位分析、RT-qPCR、酵母双杂交和分裂荧光素酶技术从分子层面阐明*OsTrxL1*参与干旱胁迫响应的调控机制。【结果】OsTrxL1蛋白定位于内质网和细胞核，RT-qPCR分析表明该基因在水稻根、茎、叶等不同组织均有表达，且受干旱、冷和盐胁迫诱导；过表达*OsTrxL1*显著增强了水稻对非生物胁迫的耐受性，表现为胁迫后存活率提高、膜脂过氧化程度降低及渗透调节能力增强，而*OsTrxL1*敲除突变体则导致抗胁迫能力降低；OsTrxL1与细胞色素P450家族成员OsCYP89A2存在物理互作。【结论】*OsTrxL1*可能通过维持内质网腔内氧化还原稳态、在胁迫条件下稳定OsCYP89A2的蛋白结构，进而正向调控水稻对非生物胁迫的响应与适应能力，为作物抗逆分子育种提供了重要的候选基因资源。

关键词： *OsTrxL1*；OsCYP89A2；干旱胁迫；内质网；水稻
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0193

OsTrxL1 Interacts with OsCYP89A2 to Cooperatively Regulate Drought Stress Responses in Rice

ZHONG Jiao REN Qiong FAN Zhao-rui DUAN Yu QIN Tong* KANG Zhen-hui*
（*College of Food and Brewing Engineering, Sichuan University of Light Industry, Yibin* 644005）

Abstract: 【Objective】This study aims to elucidate the biological function of the rice thioredoxin-like protein gene *OsTrxL1* in response to drought stress and its potential molecular regulatory mechanisms, providing a theoretical basis for a deeper understanding of rice abiotic stress responses. 【Method】CRISPR/Cas9 gene editing and transgenic techniques were used to obtain knockout and overexpression lines. The biological function of *OsTrxL1* was analyzed by measuring physiological indicators under drought stress in rice. In combination with subcellular localization analysis, RT-qPCR, yeast two-hybrid, and split luciferase assays, the molecular regulatory mechanism of *OsTrxL1* in drought stress response was elucidated. 【Result】OsTrxL1 protein was localized in the endoplasmic reticulum and nucleus. RT-qPCR analysis showed that this gene was expressed in different rice tissues including roots, stems, and leaves, and was induced by drought, cold, and salt stress. Overexpression of *OsTrxL1* significantly enhanced rice tolerance to abiotic stress, reflected by increased post-stress survival rate, reduced membrane lipid peroxidation, and enhanced osmotic regulation ability, whereas *OsTrxL1* knockout mutants exhibited reduced stress resistance. OsTrxL1 physically interacts with the cytochrome P450 family member OsCYP89A2. 【Conclusion】*OsTrxL1* may maintain redox homeostasis within the endoplasmic reticulum lumen and stabilize the protein structure of OsCYP89A2 under stress conditions, thereby positively regulating rice response and adaptation to abiotic stress, providing an important candidate gene resource for crop stress-resistance molecular breeding.

Keywords: *OsTrxL1*; OsCYP89A2; drought stress; endoplasmic reticulum; rice

收稿日期：2026-02-08
基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（31601291），五粮液集团有限公司与四川轻化工大学校地合作项目（CXY2021ZR010），四川轻化工大学人才引进项目（2024RC073），四川省科技厅项目（2020YFN0023）
*通信作者：康振辉 zhKang85@126.com，秦童 qintong_7@163.com

硫氧还蛋白（Thioredoxin, Trx）是一类广泛存在生物体中的小分子热稳定蛋白，其保守活性位点（Cys-Gly-Pro-Cys）通过可逆氧化还原反应调控靶蛋白功能，维持细胞氧化还原稳态[1-2]。植物Trx系统主要包括NADPH依赖型（NTR）与铁氧还原蛋白依赖型（FTR）两类还原酶，介导细胞器特异的氧化应激响应与基因表达调控[3]。Trx参与光合代谢、抗氧化防御及逆境适应，外界刺激可诱导其由细胞质向细胞核转移[4]，通过还原转录因子半胱氨酸残基调控基因表达[5]；部分h型Trx（如*OsTRXh1*）可分泌至细胞外，通过调节质外体活性氧（ROS）稳态参与盐胁迫和脱落酸（ABA）信号转导，从而影响植物生长与逆境适应[6]。种子萌发过程中，h3和h4型*Trx*的差异表达与贮藏物质动员相关[7]。近年来，在豆科植物中鉴定出具有非典型活性中心和内质网定位信号的新型*Trx*，在根瘤共生中特异性高表达[8]。紫花苜蓿（*Medicago truncatula*）全基因组分析显示，多个*Trx*成员在冷、旱、盐胁迫下表达显著变化[3]，且*Trx*与过氧化物酶体生物发生蛋白（如Pex5、Pex14）的互作揭示了其在细胞区室间氧化还原通讯中的潜在作用。

Trx家族由典型Trx与Trx样蛋白构成，Trx样蛋白主要包括Trx-like2（TrxL2）和非典型Cys-His-rich Trx（ACHT）。这类蛋白具有CxxC型模体及较高中点氧化还原电位，可氧化多种Trx靶蛋白[9-10]。拟南芥中TrxL2含WCRKC活性位点，主要氧化叶绿体ATP合成酶γ-亚基（CF1-γ），而ACHT含WCG/ASC位点[11-12]，主要氧化果糖-1,6-二磷酸酶（FBPase）。高氧还蛋白样蛋白CDSP32作为叶绿体Trx样蛋白，调控逆境下的光合与氧化还原状态[13]。

目前硫氧还样蛋白家族在水稻非生物胁迫中的功能机制尚不明确。植物通过感知干旱信号、激活应答基因，在生理代谢与生长发育层面进行适应性调整。胁迫诱导ROS与丙二醛（MDA）[14]积累，引发脂质过氧化与膜损伤。干旱触发保护性酶类与激素合成，维持离子稳态并清除ROS[15]。*RoLe1*、*HMGB1*、*OsDREB1C*以及*DRO1*[16]等许多耐旱关键基因的功能研究均集中在这一核心环节，例如过表达*OsDREB1C*可协同提升产量并缩短生长期[17]，*DRO1*通过调控根系构型增强抗旱性[18]，ABA则作为核心激素激活胁迫应答基因[19]。

细胞色素P450（CYPs）是生物体中参与NADPH和/或O_2依赖性羟基化反应的最大酶家族，多为内质网锚定的血红素蛋白[20-21]。CYPs在外源解毒、次级代谢物及植物激素合成中发挥多功能催化作用，调控植物对干旱、高温[22]、盐[23]及重金属胁迫[24]的响应，并促进逆境下代谢副产物的解毒。

本研究通过全基因组分析鉴定了一个内质网和核定位的*Trx-like*基因，命名为*OsTrxL1*，其生物学功能在水稻中未见报道。细胞色素P450家族成员*OsCYP89A2*已经被证明在干旱胁迫后表达显著上调[25]。但*OsTrxL1*是否参与水稻非生物胁迫应答，以及与*OsCYP89A2*的关系仍有待探究。因此，解析*OsTrxL1*和*OsCYP89A2*在关键氧化还原与代谢调控中的关系，对于理解水稻抗旱机制并提升其抗逆性具有重要的理论与应用价值。

1　材料与方法

1.1　材料

所有试验均以水稻中花11（*Oryza sativa* L.，Zhonghua 11，粳稻品种）为野生型对照；由百格基因科技（江苏）有限公司构建*OsTrxL1*过表达（OE）植株，经潮霉素和GUS染色筛选，获得T_0代阳性幼苗，繁代后得T_2代纯合株，RT-qPCR检测*OsTrxL1*基因表达水平；在*OsTrxL1*基因序列上设计sgRNA靶标为：5′-ATTCGGTGGACCATTCTGCAGGG-3′，由武汉伯远生物科技有限公司完成。构建*OsTrxL1*敲除（KO）植株，对T_0代敲除株通过引物KO-F和KO-R（附表1）进行DNA测序确认敲除效果，通过田间繁代获取T_2代纯合突变株。发芽后点种至96孔水培盒里，选用木村B营养液[26]（pH 5.8）种植于四川轻化工大学人工气候室培养，其间每2 d换1次营养液（室温28 ℃，16 h光照/8 h黑暗）或种植于四川省宜宾市李庄镇水田（北纬28°48′9"、东经104°47′31"）。

1.2　方法

1.2.1　全基因组分析　利用MEME在线程序（https://meme-suite.org/meme/index.html）分析了*Trx*家族的保守基序。并从GFF文件中提取了*Trx*基因的结构信息。使用TBtools软件对结果进行了可视化。从Ensembl Plants获得*Trx*的染色体位置信息，并使用TBtools软件作图。使用PlantCARE工具提取并鉴定*Trx*

基因的2 kb启动子序列，用于顺式作用调控分析。使用TBtools软件对结果进行了可视化。利用ProtParam（http://web.expasy.org/protparam/）、ProtScale（http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl）、TMHMM2.0（https://services. healthtech. dtu. dk/services/TMHMM-2.0/）分析OsTrxL1蛋白的理化性质、亲水性、疏水性和跨膜结构。

1.2.2 *OsTrxL1*启动子驱动GUS表达 克隆*OsTrxL1*启动子序列（ATG上游2 000 bp），构建诱导*GUS*基因在水稻中表达的植物双元表达载体，并命名为*OsTrxL1 Pro*::*GUS*，经农杆菌介导转化中花11水稻愈伤，筛选得到稳定表达的水稻转基因株系。

1.2.3 蛋白亚细胞定位 将OsTrxL1的C端融合eGFP后构建亚细胞定位载体。质粒载体通过农杆菌GV3101介导法转入烟草表皮中进行瞬时表达，以空载体eGFP为对照。转化后24 h用共焦激光扫描显微镜（CarlZeiss LSM710，Oberkochen，Germany）捕获荧光信号。在488、561和585 nm处激发GFP、叶绿体自身荧光和细胞核自发荧光，分别在510、650和607 nm处收集发射光谱，NLS-mkate蛋白设置为核定位marker。

1.2.4 基因表达 将萌发的*OsTrxL1 Pro*::*GUS*幼苗胁迫后染色进行胁迫诱导分析。提取86 d水稻根、茎、叶、节和穗组织的RNA用于*OsTrxL1*组织表达分析。对三叶一心期水稻幼苗分别进行100 mmol/L NaCl、20% PEG6000、4 ℃处理3 h；取水稻幼苗置入20% PEG6000胁迫培养0、1、3、9、12、24 h后取样，置于液氮保存。提取总RNA，逆转录合成cDNA，以*OsActin*为内参，通过RT-qPCR扩增检测*OsTrxL1*基因的表达量（附表1）。

1.2.5 非生物胁迫 选取饱满的水稻种子，萌发前用75%（v/v）乙醇消毒30 s，2.5%（w/v）的次氯酸钠消毒40 min，无菌水清洗2–3次，转移至含有200 mmol/L Mannitol、150 mmol/L NaCl、100 μmol/L ABA的1/2 MS培养基中，同时4 ℃胁迫处理。28 ℃、16 h光照/8 h黑暗生长12 d后统计苗高（地上部幼苗高度）和不定根数量。将土培3周后的幼苗，停止灌溉5 d和10 d，观察生长状态。取两周龄的幼苗新鲜叶片测定离体叶片失水率，同时通过25% PEG6000处理4 d后统计存活率，重复3次。

1.2.6 农艺性状 水稻生长至成熟期后，测量其株高、有效分蘖数、剑叶长、剑叶宽、穗长、粒长、粒宽等农艺性状，重复≥3次。

1.2.7 生理生化指标 对水稻幼苗采用20% PEG6000溶液模拟干旱胁迫处理3 h后，测定丙二醛（MDA）含量及超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化物酶（POD）的酶活性，重复3次；同时，分别在20% PEG6000处理6、12和24 h后，对水稻幼苗进行二氨基联苯胺（DAB）染色和氮蓝四唑（NBT）染色，以检测活性氧（ROS）的积累情况。

1.2.8 蛋白互作 蛋白跨膜预测显示OsTrxL1是一个跨膜蛋白，因此利用融合分裂泛素的酵母双杂交系统筛选与OsTrxL1互作的蛋白。以构建的pBT3-STE-OsTrxL1为诱饵载体，分别进行毒性和自激活检测后，筛选ZH11双杂交膜酵母文库，采用的质粒组合分别是阳性对照组（pTSU2-APP+NubG-Fe65）、阴性对照组（pTSU2-APP+pPR3-N）、实验组（OsCYP89A2+OsTrxL1），毒性检测与自激活测试组（pBT3-STE-OsTrxL1+pPR3-N），经过对阳性克隆的多重报告基因检测、DNA测序、BLAST比对分析和酵母回转验证，确定与OsTrxL1相互作用的蛋白。对于阳性互作蛋白的验证，将酵母双杂交筛选到的候选蛋白与*OsTrxL1*的CDS序列分别重组到分裂荧光素酶Cluc和Nluc载体上，通过农杆菌GV1301介导瞬时转化烟草后通过活体成像仪进行观察拍摄。

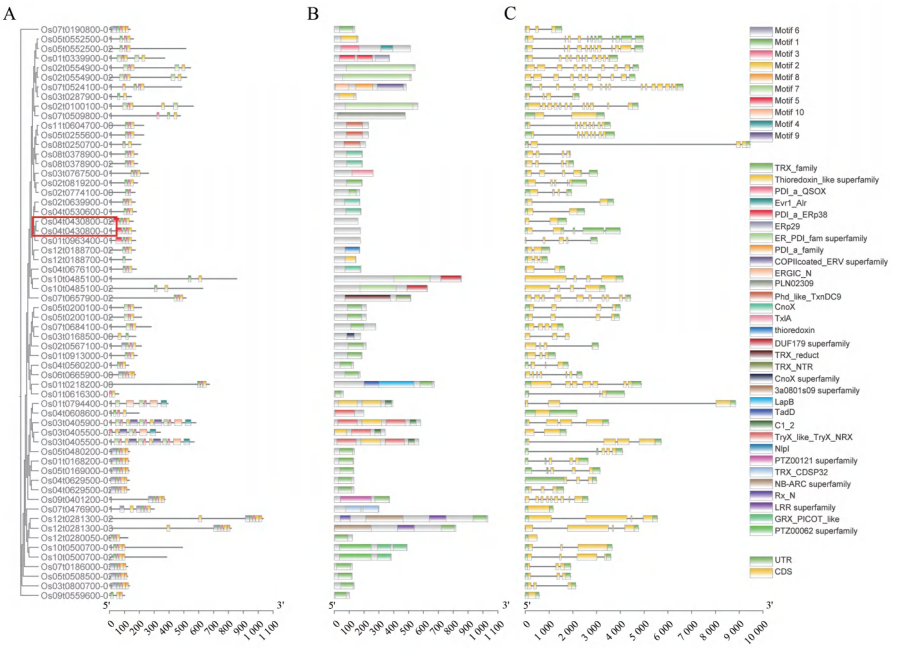
1.2.9 数据处理 使用Excel 2010软件进行数据整理和绘图，利用GraphPad Prism 10.4.0进行差异显著性分析，采用Adobe Photoshop 2025软件作图。数据采用*t*检验分析。

2 结果

2.1 全基因组分析

通过全基因组分析，鉴定出60个推测的*Trx*基因，10个保守基序（图1-A、B）；基因结构分析显示，每个*Trx*基因至少包含3个外显子，*Trx*基因的内含子数量不同（图1-C）；48个*Trx*基因位于12条不同的染色体上，1号和7号染色体含有7个*Trx*基因，3号、4号和5号染色体含6个，而*OsTrxL1*基因位于4号染色体（附图1）；共线性分析显示，*OsTrx*与拟南芥中的*AtTrx*有4个同源物（附图2），且表现出一对多纯合性。*Trx*基因的启动子包含响应脱落

酸、茉莉酸甲酯和赤霉素等顺式作用元件，可能显著影响其生物学功能（附图3）。其中NRX亚族包含有*Trx*类似基因，而一个功能未知的硫氧还蛋白样蛋白基因Os04g36640被定义成假定的脱水反应元件结合蛋白，暗示该基因可能以一种氧化还原调控的方式调控水稻干旱胁迫，因此命名为*OsTrxL1*。OsTrxL1是一个由266个氨基酸组成的蛋白质，编码序列全长801 bp，相对分子质量为29.55 kD，理论等电点（pI）为4.86，不稳定系数（instability index）为39.66，亲水性平均系数（grand average of hydropathicity）为0.644，存在2个跨膜结构，由此可推断出OsTrxL1是一个稳定的跨膜疏水蛋白。



A：水稻*Trx*基因家族系统发育树；B：水稻Trx蛋白中保守基序的表达；C：水稻*Trx*基因家族的外显子–内含子结构

A: Phylogenetic tree of the rice *Trx* gene family; B: expression of conserved motifs in rice *Trx* proteins; C: exon-intron structures of the rice *Trx* gene family

图1　系统发育树、保守基序和基因结构

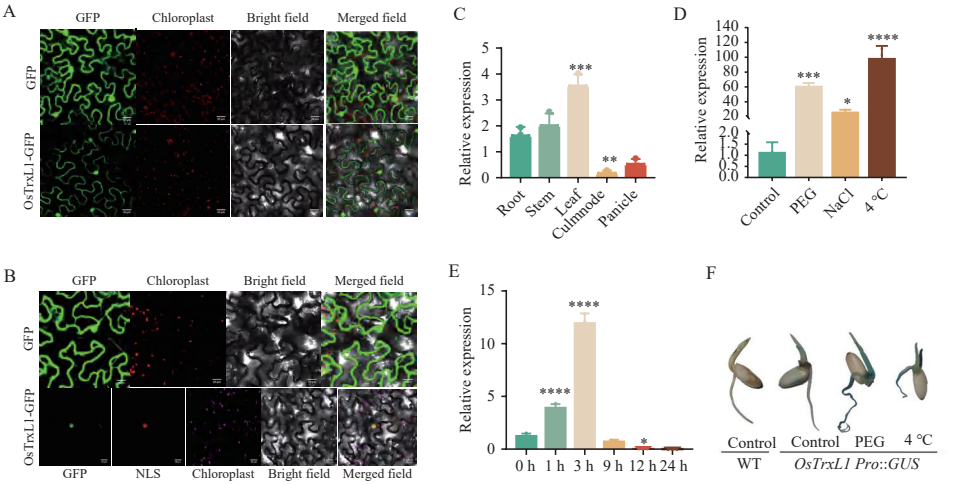
Fig. 1　Phylogenetic tree, conserved motifs, and gene structures

2.2　蛋白亚细胞定位和基因表达特性分析

烟草表皮细胞定位和共定位结果表明，OsTrxL1定位于内质网和细胞核（图2-A、B）。RT-qPCR分析结果显示*OsTrxL1*在根、茎、叶、节和穗中均有表达，叶中表达量最高，节中最低（图2-C）。在20% PEG6000、150 mmol/L NaCl、4 ℃处理后，*OsTrxL1*表达均显著升高，且受干旱和低温显著诱导（图2-D），*OsTrxL1*受到干旱胁迫后，表达量呈现先增后降的趋势（图2-E），在3 h表达量达到峰值。在20% PEG6000以及4 ℃处理下，与对照相比，*OsTrxL1 Pro*::*GUS*转基因植物GUS染色加深（图2-F），表明植物在应对干旱和低温胁迫时上调了*OsTrxL1*的基因表达，提示*OsTrxL1*可能在水稻非生物胁迫（尤其是干旱胁迫与低温胁迫）的适应性应答过程中发挥了重要作用。这些结果表明*OsTrxL1*在水稻叶中受多种非生物胁迫诱导表达，其编码蛋白定位于内质网和细胞核。

2.3　*OsTrxL1*正向响应多重非生物胁迫

构建并鉴定了*OsTrxL1*的水稻KO和OE株系（图3-A、B），在正常培养条件下，WT与OE和KO株系表型无显著差异；在模拟干旱和盐胁迫处理12 d后，OE株系的苗高和不定根数均明显高于WT，而KO株系则相反，表明*OsTrxL1*的过表达增强水稻抗旱性和耐盐性；100 μmol/L外源ABA处理12 d后，与WT相比，OE株系不敏感，而KO株系显著敏感；在低温生长12 d后OE株系相比于WT，萌发后生长



A:OsTrxL1烟草表皮细胞中的亚细胞定位,bar=20 μm;B:OsTrxL1烟草表皮细胞共定位,绿色荧光表示GFP信号,红色荧光表示叶绿体自发荧光(Chloroplast)和细胞核自发荧光(NLS),明场(Bright),bar=20 μm ;C:*OsTrxL1*在水稻不同组织中的表达水平(vs. Root)。D:*OsTrxL1*不同胁迫方式的基因表达水平(20% PEG6000、150 mmol/L NaCl);E:*OsTrxL1*在干旱胁迫下不同时间点的基因表达水平(vs. Control);F:*OsTrxL1 pro*::*GUS*染色。数据表示为平均值±标准差。采用*t*检验分析数据(*n*=3;**P*<0.05;***P*<0.01;****P*<0.001;*****P*<0.000 1),下同

A: Subcellular localization of OsTrxL1 in tobacco epidermal cells, bar=20 μm. B: Colocalization of OsTrxL1 in tobacco epidermal cells, green fluorescence indicates GFP signal, red fluorescence indicates chloroplast autofluorescence and nuclear autofluorescence (NLS), bright field (Bright), bar=20 μm. C: Expression levels of *OsTrxL1* in different rice tissues (vs. Root). D: Gene expression levels of *OsTrxL1* under different stress treatments (20% PEG6000, 150 mmol/L NaCl). E: Gene expression levels of *OsTrxL1* at different time points under drought stress (vs. Control). F: *OsTrxL1 pro*::*GUS* staining. Data are presented as mean± standard deviation. Data were analyzed using *t*-test, (*n*=3; **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001; *****P*<0.000 1), the same below

图2 *OsTrxL1*的亚细胞定位和表达模式

Fig. 2 Subcellular localization and expression pattern of *OsTrxL1*

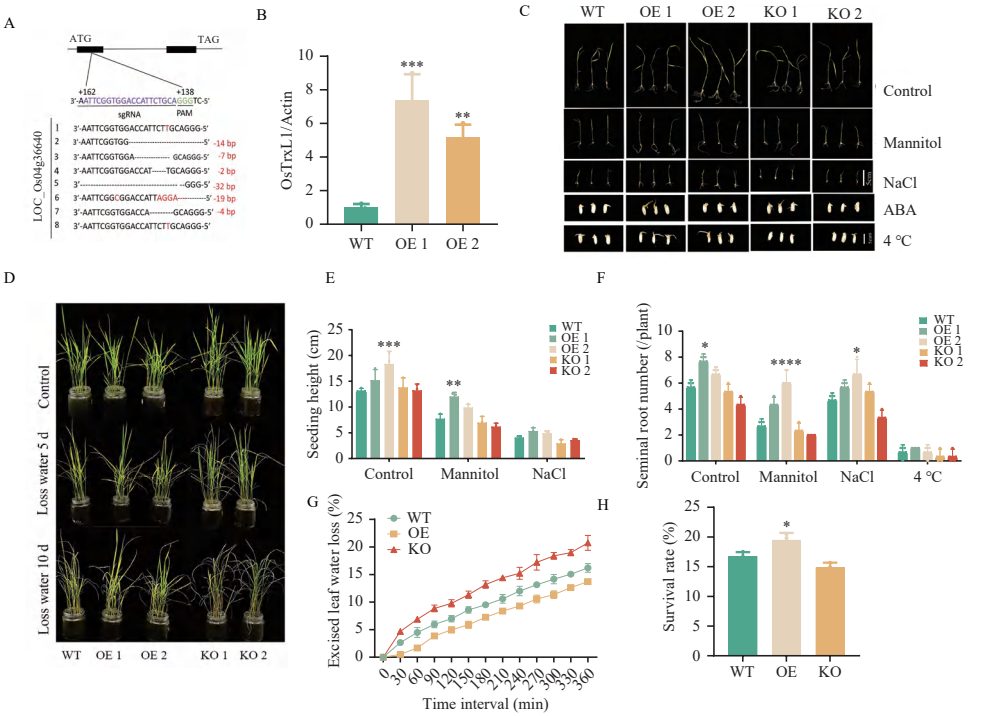
受阻程度较小，而KO株系显著受到低温影响基本丧失萌发能力（图3-C、E–F）。失水胁迫实验动态表型分析结果表明，WT和KO植株在断水5 d后叶片开始萎蔫，胁迫持续至10 d时叶片卷曲程度显著加剧，且KO的干旱响应更早，呈现出典型干旱敏感表型（图3-D），失水胁迫耐受性显著降低。相反，OE则表现出更强的抗旱能力，断水5 d无明显萎蔫与叶色改变，胁迫10 d时仅少量叶片干枯，干旱胁迫耐受能力显著优于WT与KO株系。两周龄新鲜叶片经过非胁迫性自然脱水处理后，相比WT，OE株系叶片的失水进程显著延缓，保水能力显著提升，KO反之（图3-G）；25% PEG6000处理条件下，OE株系相比WT存活率提高，KO株系存活率降低（图3-H）。结果表明，*OsTrxL1*-OE可提高水稻在萌发及幼苗期对多种非生物胁迫的耐受性。

2.4 水稻农艺性状统计分析

统计分析了大田种植条件下的水稻成熟期农艺性状及产量。结果显示，与WT相比，OE和KO株系株高、穗长均显著降低（图4-A–D），提示*OsTrxL1*可能通过调控赤霉素、细胞分裂素合成及信号转导影响水稻生长；粒型性状表明，OE株系粒长显著长于WT和KO株系，粒宽显著大于WT，而KO株系粒宽显著小于WT（图4-E–H）；OE株系分蘖数显著低于WT和KO株系（图4-J）；此外，OE和KO株系剑叶长度均显著缩短，OE株系剑叶宽度显著升高，KO株系则显著降低（图4-K–L）。然而，3个株系间的千粒重无显著差异（图4-I）。综上，*OsTrxL1*对水稻株高、叶型、穗型和粒型具有显著影响。

2.5 *OsTrxL1*过表达提高了水稻干旱耐受性

为进一步阐明*OsTrxL1*基因调控水稻耐受干旱胁迫的潜在生理机制，检测了干旱条件下水稻的MDA含量、SOD和POD活性及ROS积累情况。在正常生长条件下，OE、KO与WT的MDA含量、SOD及POD活性均无显著差异。经20% PEG6000模拟干旱处理3 h后，所有水稻株系的MDA含量均显著升高，OE株系MDA含量增幅最小，KO株系MDA含量最高



A：CRISPR/Cas9编辑T_1代的序列对比图，图中划线序列代表sgRNA和PAM序列，红色字体指碱基序列变化情况。B：*OsTrxL1*在WT和OE过表达T_2代株系的表达水平。C：Control、200 mmol/L Mannitol、150 mmol/L NaCl（bar=5 cm）、100 μmol/L ABA、4 ℃（bar=5 mm）处理下野生型（WT）、过表达株系（OE）及敲除株系（KO）幼苗发育情况；D：失水胁迫（5 d、10 d）处理后各株系的表型；E：苗高；F：不定根数（200 mmol/L Mannitol、150 mmol/L NaCl）；G：叶片失水率；H：25% PEG6000处理下植株存活率

A: Sequence comparison diagram of the CRISPR/Cas9-edited T_1 generation. The underlined sequences represent the sgRNA and PAM sequences, and red text indicates nucleotide sequence changes. B: Expression level of *OsTrxL1* in the OE (overexpression) line at the T_2 generation and WT plants. C: Seedling development of wild-type (WT), overexpression (OE), and knockout (KO) lines under control conditions, 200 mmol/L mannitol, 150 mmol/L NaCl (bar=5 cm), 100 μmol/L ABA, and 4 ℃ (bar=5 mm). D: Phenotypes of each line after drought stress treatment for 5 and 10 days. E: Seedling height. F: Adventitious root number under 200 mmol/L mannitol and 150 mmol/L NaCl. G: Leaf water loss rate. H: Survival rate of plants under 25% PEG6000 treatment

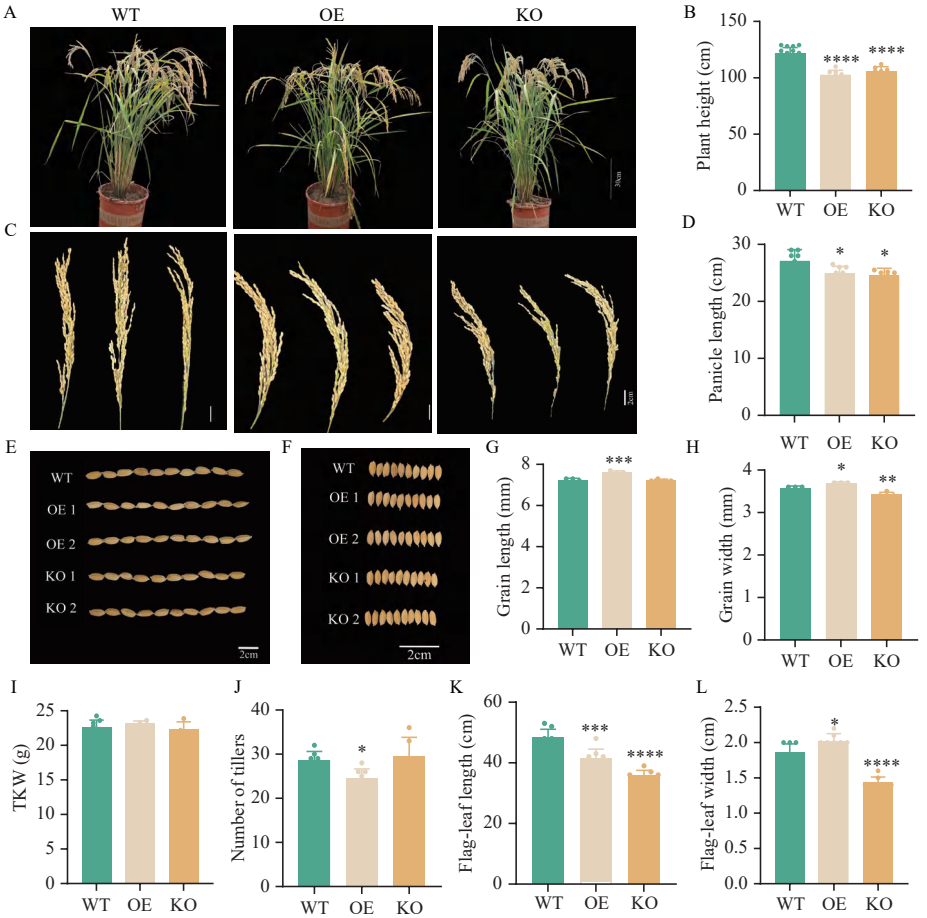
图3　*OsTrxL1*转基因株系的幼苗生长和失水表型

Fig. 3　Seedling growth and water loss phenotypes of *OsTrxL1* transgenic lines

（图5-A）；同时，干旱胁迫诱导各株系SOD活性升高，OE株系SOD活性高于WT及KO株系，KO株系SOD活性相对较低（图5-B），POD活性呈现与SOD一致的变化趋势（图5-C）。进一步通过NBT和DAB染色验证ROS积累情况，胁迫处理前各株系染色差异不明显，随着胁迫时间延长，OE株系叶片染色深度显著浅于WT，KO株系染色始终深于WT，表明KO株系积累了更多超氧阴离子和H_2O_2（图5-D–E）。由此可见，过表达*OsTrxL1*可提高干旱胁迫下SOD、POD活性，增强ROS清除能力，减少膜脂过氧化损伤；敲除*OsTrxL1*基因则削弱水稻抗氧化能力，使其对干旱胁迫更敏感。结果表明，*OsTrxL1*可通过维持细胞内ROS稳态调控水稻干旱耐受能力。

2.6　OsTrxL1与OsCYP89A2物理互作

为探究OsTrxL1调控水稻干旱响应的分子机制，利用酵母双杂交系统筛选其互作候选蛋白。因OsTrxL1被预测含2个跨膜结构，故采用融合分裂泛素的诱饵质粒筛选水稻cDNA酵母膜文库。诱饵质粒验证显示，诱饵与猎物空载共转化后，DDO平板可生长（表明无毒性且转化成功），TDO/X、QDO/X平板不生长（无自激活）；Post-Nubl与pBT3-STE-OsTrxL1共转化后，各平板均有菌落生长，读码框正确、泛素系统功能正常（图6-A），可用于筛库。以含正确诱饵质粒的酵母为受体，转入ZH11双杂交膜文库质



A–B：成熟期株高，Bar=30 cm；C、D：穗长，Bar=2 cm；E、G：粒长；F、H：粒宽，Bar=2 cm；I：千粒重；J：分蘖数；K：剑叶长；L：剑叶宽

A–B: Mature plant height, Bar=30 cm. C, D: Spike length, Bar=2 cm. E, G: Grain length. F, H: Grain width, Bar=2 cm. I: Thousand-grain weight. J: Tillering number. K: Flag leaf length. L: Flag leaf width

图4 *OsTrxL1*转基因株系相关农艺性状

Fig. 4 Agronomic traits related to *OsTrxL1* transgenic lines

粒并筛选，对QDO平板上生长且变蓝的阳性菌落进行PCR扩增和序列比对，最终获得11个与OsTrxL1互作的候选蛋白（表1）。

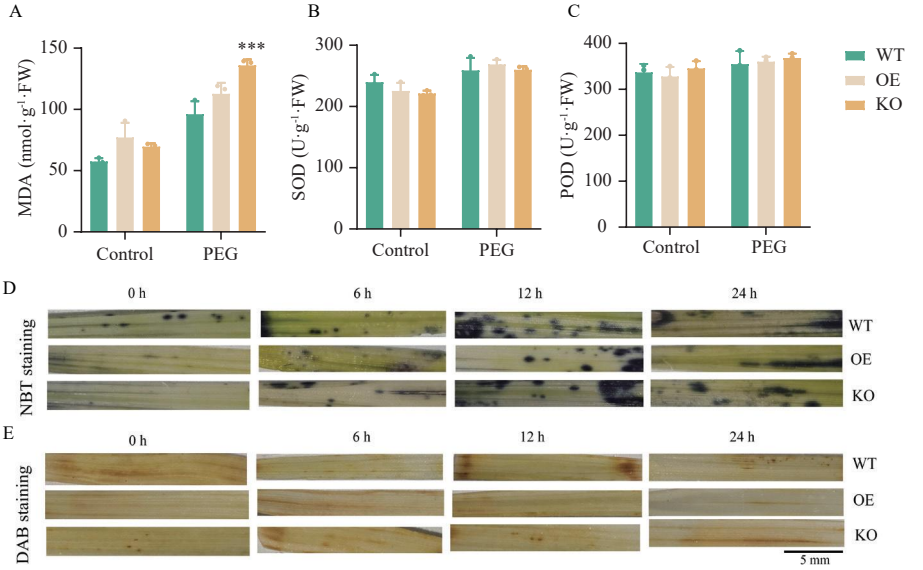
分析候选蛋白发现OsCYP89A2与OsTrxL1的功能最相关，有报道显示水稻在干旱胁迫后，*OsCYP89A2*的表达水平显著上升[25]。因此，通过酵母回转实验验证了OsCYP89A2和OsTrxL1的相互作用（图6-B），OsCYP89A2+OsTrxL1在QDO平板上长出明显菌落，且加入X-α-gal后明显变蓝，表明OsCYP89A2与OsTrxL1确实存在相互作用。

通过荧光素酶互补体内实验进一步验证了OsTrxL1与OsCYP89A2在细胞内的互作。化学发光成像系统显示（图6-C）荧光信号（红色区域）仅在OsTrxL1-Nluc与OsCYP89A2-Cluc共表达组中特异性富集，表明OsTrxL1与OsCYP89A2二者在植物细胞内发生直接蛋白互作。结果表明OsTrxL1与OsCYP89A2可能协同调控水稻干旱胁迫响应。

3 讨论

TRX家族成员广泛分布在不同细胞器中，参与蛋白质加工、脂质合成及胁迫信号传导等过程[27]，本研究发现*OsTrxL1*可能在内质网介导的胁迫应答通路中发挥作用。

干旱胁迫会诱导植物细胞ROS大量积累，引发蛋白氧化损伤及代谢紊乱，而Trx可通过还原抗氧化

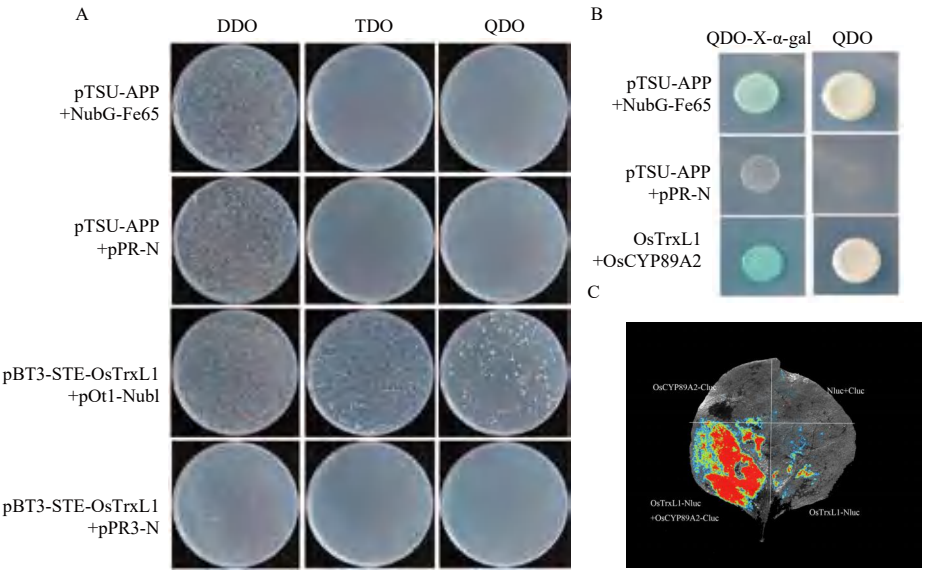


A：丙二醛；B：超氧化物歧化酶；C：过氧化物酶；D：NBT染色；E：DAB染色。PEG：20% PEG6000处理3 h，Bar=5 mm

A: Malondialdehyde. B: Superoxide dismutase. C: Peroxidase. D: NBT staining. E: DAB staining. PEG: 20%PEG6000 treatment for 3 h, Bar=5 mm

图5　*OsTrxL1*转基因株系在20% PEG6000模拟干旱处理3 h生理生化指标

Fig. 5　Physiological and biochemical indicators of *OsTrxL1* transgenic lines under 20% PEG6000 simulated drought treatment for 3 h



A：诱饵自激活及功能验证；B：酵母回转验证；C：荧光素酶蛋白互补实验

A: Self-activation and functional validation of the bait. B: Yeast two-hybrid confirmation. C: Luciferase protein complementation assay

图6　OsTrxL1与OsCYP89A2的酵母双杂交筛选与荧光素酶蛋白互补实验

Fig. 6　Yeast two-hybrid screening and luciferase protein complementation assay for OsTrxL1 and OsCYP89A2

酶维持其活性、激活氧化还原信号通路两种途径清除ROS。拟南芥Trxh型蛋白位于细胞质和其他亚细胞器中，*AtTrx-h2*的表达增强了抗氧化防御能力，并提高了耐盐性[28]，在内质网中参与应激相关蛋白

表1 酵母双杂交系统筛选到的OsTrxL1候选互作蛋白

Table 1 Candidate interacting proteins of OsTrxL1 identified by the yeast two-hybrid system

NO.	Protein names	Identities	Notes
1	40S ribosomal protein S14	151/151(100%)	Sequence ID: XP_015627702.1
2	Cytochrome P450 89A2	249/249(100%)	GeneID:4349105
3	DNA-binding protein MNB1B	157/157(100%)	Sequence ID: XP_015643271.1
4	FLO/LFY-like protein, partial	247/248(99%)	Sequence ID: AFA43522.1
5	Hypothetical protein DAI22_04g114500	92/95(97%)	Sequence ID: KAF2933812.1
6	Hypothetical protein EJB05_02252, partial	26/34(76%)	Sequence ID: TVU50860.1
7	Pleckstrin homology (PH) domain-containing protein-like	82/82(100%)	Sequence ID: BAD82044.1
8	Putative chloroplastic RNA-binding protein, with alternative splicing isoforms	271/288(94%)	Sequence ID: AAS01974.1
9	Ribosomal L1 domain-containing protein 1	266/268(99%)	GeneID:4339582
10	Tubulin alpha-1 chain, putative, expressed	129/129(100%)	Sequence ID: ABF98641.1
11	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp31 homolog isoform X1	265/265(100%)	GeneID:4336619

如OsPDIL1-5[29]的氧化还原修饰与正确折叠，维持内质网稳态，减少干旱诱导的蛋白错误折叠损伤；在细胞核中参与干旱响应相关基因如*OsNAC17*[30]、*OsbZIP46*[31]的氧化还原调控，激活抗逆基因的转录表达，构建系统性抗氧化防御体系来维持蛋白质功能，从而提高水稻对逆境的抗性。结合*OsTrxL1*的双重定位特性，推测其可通过以上2种途径调控水稻干旱耐受性。本文中*OsTrxL1*基因的表达受干旱、低温及盐胁迫显著诱导，表明*OsTrxL1*可能参与水稻对多种非生物胁迫的交叉适应机制。时间动态表达分析显示，PEG胁迫3 h后该基因表达量达到峰值，随后逐渐下降，反映了植物在胁迫初期快速启动防御机制的应答策略，推测*OsTrxL1*可能在干旱胁迫早期信号传导中发挥即时调控作用。此外*OsTrxL1*过表达显著提高了水稻的耐旱性，其机制与增强SOD、POD等抗氧化酶活性，降低膜脂过氧化损伤（MDA含量）密切相关。

部分P450蛋白通过调控抗氧化物质合成或胁迫信号传导参与植物耐旱性调控，例如苜蓿中细胞色素P450基因*MsCYP71*通过光合能力正向调节其抗旱性[32]，高粱植物*CYP71A25*和*CYP71B2*富集启动子基序综合应激非生物胁迫[33]，中国柑橘中*CsCYT75B1*参与抗氧化类黄酮的代谢，通过提高活性氧清除能力来提高耐旱性[34]。CYP450家族的大部分成员定位于内质网膜上[35-36]，其功能成熟依赖内质网内特定的氧化还原环境，既需要维持新生肽链的正确折叠，又要避免过度氧化导致的构象异常[37]。而硫氧还蛋白样蛋白是内质网氧化还原系统的核心组分，通过活性位点的-Cys-X-X-Cys-基序，催化二硫键的形成、异构化或还原，调控内质网内的氧化还原稳态[38]。对于CYP450而言，其折叠过程虽不依赖自身二硫键的形成，但若内质网过度氧化[39]，可能导致CYP450的保守半胱氨酸发生异常氧化，从而抑制其与血红素辅基的结合，影响全酶的成熟，故内质网中由硫氧还蛋白样蛋白维持的氧化还原平衡是其正常折叠的前提。硫氧还蛋白样蛋白可通过还原异常氧化的半胱氨酸残基，恢复CYP450的血红素结合能力，保障其功能成熟。本研究通过酵母双杂交筛库与双分子荧光素酶共同证实，OsTrxL1与OsCYP89A2存在特异性物理互作，且都定位于内质网，二者可能在内质网膜上形成功能复合体，影响下游基因表达或代谢物合成，共同参与干旱胁迫响应的调控通路。

本文虽明确了*OsTrxL1*基因的耐旱功能及部分调控机制，但仍存在有待深入探讨的问题，OsTrxL1与OsCYP89A2互作的具体位点及互作后对二者功能的影响尚未明确，需通过体外蛋白互作实验与点突变分析进一步验证。*OsTrxL1*参与的下游靶基因及调控通路尚未完全解析，需结合转录组与代谢组分析，挖掘其调控网络中的关键节点。以及在不同遗传背景水稻中的耐旱效果及对其他农艺性状的影响仍需通过多年多点田间试验验证。未来研究可聚焦于上述问题，深入解析*OsTrxL1*介导的干旱胁迫调控网络，同时利用基因编辑与转基因技术，结合分子标

记辅助育种，培育兼具高耐旱性与优良农艺性状的水稻新品种，为应对全球气候变化引发的干旱胁迫提供更有效的解决方案。

4　结论

本研究成功克隆水稻*OsTrxL1*，明确其编码不稳定疏水蛋白，定位于细胞核和内质网。*OsTrxL1*在叶片中高表达，且受干旱、低温、盐胁迫显著诱导，表现出快速响应的表达特征。*OsTrxL1*通过调控抗氧化系统及与OsCYP89A2互作参与水稻干旱胁迫响应的分子机制，为水稻耐旱分子育种提供了新的基因靶点与理论依据。

文章所有附图附表请点击链接查看（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260520173530_NewsFile_13.pdf）

参考文献

[1] He ZM, Yan Y, Guo XJ, et al. Trp31 residue of trx-1 is essential for maintaining antioxidant activity and cellular redox defense against oxidative stress [J]. Antioxidants, 2025, 14(3): 257.

[2] Sugiura K, Yokochi Y, Fu NE, et al. The thioredoxin (Trx) redox state sensor protein can visualize Trx activities in the light/dark response in chloroplasts [J]. J Biol Chem, 2019, 294(32): 12091-12098.

[3] Xu LG, Zhou Y, Cheng J, et al. Identification of thioredoxin genes and analysis of their expression under abiotic stresses in *Medicago truncatula* [J]. Acta Physiol Plant, 2022, 44(11): 120.

[4] Nikkanen L, Rintamäki E. Chloroplast thioredoxin systems dynamically regulate photosynthesis in plants [J]. Biochem J, 2019, 476(7): 1159-1172.

[5] Lee ES, Park JH, Wi SD, et al. Demyristoylation of the cytoplasmic redox protein trx-h2 is critical for inducing a rapid cold stress response in plants [J]. Antioxidants, 2021, 10(8): 1287.

[6] You J, Chan ZL. ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants [J]. Front Plant Sci, 2015, 6: 1092.

[7] Hägglund P, Finnie C, Yano H, et al. Seed thioredoxin h [J]. BBA Proteins Proteom, 2016, 1864(8): 974-982.

[8] Sainz MM, Filippi CV, Eastman G, et al. Analysis of thioredoxins and glutaredoxins in soybean: evidence of translational regulation under water restriction [J]. Antioxidants, 2022, 11(8): 1622.

[9] Yokochi Y, Fukushi Y, Wakabayashi KI, et al. Oxidative regulation of chloroplast enzymes by thioredoxin and thioredoxin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(51): e2114952118.

[10] Sekiguchi T, Yoshida K, Wakabayashi KI, et al. Dissipation of the proton electrochemical gradient in chloroplasts promotes the oxidation of ATP synthase by thioredoxin-like proteins [J]. J Biol Chem, 2022, 298(11): 102541.

[11] Fukushi Y, Yokochi Y, Hisabori T, et al. Overexpression of thioredoxin-like protein ACHT2 leads to negative feedback control of photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. J Plant Res, 2024, 137(3): 445-453.

[12] 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.

[13] Zhang HH, Liu XQ, Zhang HB, et al. Thioredoxin-like protein CDSP32 alleviates Cd-induced photosynthetic inhibition in tobacco leaves by regulating cyclic electron flow and excess energy dissipation [J]. Plant Physiol Biochem, 2021, 167: 831-839.

[14] Sachdev S, Ansari SA, Ansari MI, et al. Abiotic stress and reactive oxygen species: generation, signaling, and defense mechanisms [J]. Antioxidants, 2021, 10(2): 277.

[15] Gechev T, Petrov V. Reactive oxygen species and abiotic stress in plants [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(20): 7433.

[16] Han SC, Wang YL, Li YX, et al. The OsNAC41-RoLe1-OsAGAP module promotes root development and drought resistance in upland rice [J]. Mol Plant, 2024, 17(10): 1573-1593.

[17] Wei SB, Li X, Lu ZF, et al. A transcriptional regulator that boosts grain yields and shortens the growth duration of rice [J]. Science, 2022, 377(6604): eabi8455.

[18] Uga Y, Sugimoto K, Ogawa S, et al. Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions [J]. Nat Genet, 2013, 45(9): 1097-1102.

[19] Perreau F, Frey A, Effroy-Cuzzi D, et al. ABSCISIC ACID-DEFICIENT4 has an essential function in both *cis*-violaxanthin and *cis*-neoxanthin synthesis [J]. Plant Physiol, 2020, 184(3): 1303-1316.

[20] Williams D, De Luca V. Plant cytochrome P450s directing monoterpene indole alkaloid (MIA) and benzylisoquinoline alkaloid (BIA) biosynthesis [J]. Phytochem Rev, 2023, 22(2): 309-338.

[21] Pandian BA, Sathishraj R, Djanaguiraman M, et al. Role of cytochrome P450 enzymes in plant stress response [J]. Antioxidants, 2020, 9(5): 454.

[22] Tamiru M, Undan JR, Takagi H, et al. A cytochrome P450, OsDSS1, is involved in growth and drought stress responses in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Mol Biol, 2015, 88(1-2): 85-99.

[23] Wang M, Yuan JR, Qin LM, et al. *TaCYP81D5*, one member in a wheat cytochrome P450 gene cluster, confers salinity tolerance via reactive oxygen species scavenging [J]. Plant Biotechnol J, 2020, 18(3): 791-804.

[24] Liu B, Song ZY, Qi XQ. Plant cytochrome P450 enzymes for bioactive metabolites biosynthesis, growth regulation, and stress adaptation [J]. Plant Physiol, 2025, 199(1): kiaf297.

[25] Bang SW, Lee DK, Jung H, et al. Overexpression of *OsTF1L*, a rice HD-Zip transcription factor, promotes lignin biosynthesis and stomatal closure that improves drought tolerance [J]. Plant Biotechnol J, 2019, 17(1): 118-131.

[26] Riaz M, Ali Q, Yan L. Calcium-L-aspartate nanoparticles mitigate Boron toxicity in rice seedlings by modulating physiological, antioxidant, and cell wall mechanisms [J]. Sci Rep, 2025, 15: 42439.

[27] Zhang SX, Yu Y, Song TQ, et al. Genome-wide identification of foxtail millet's TRX family and a functional analysis of SiNRX1 in response to drought and salt stresses in transgenic *Arabidopsis* [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 946037.

[28] Ji MG, Park HJ, Cha JY, et al. Expression of *Arabidopsis thaliana* Thioredoxin-h2 in *Brassica napus* enhances antioxidant defenses and improves salt tolerance [J]. Plant Physiol Biochem, 2020, 147: 313-321.

[29] Chen JL, Zhang J, Fang C, et al. OsPDIL1-5: dual role in promoting growth and development while modulating drought stress tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Front Plant Sci, 2024, 15: 1479726.

[30] Jung SE, Kim TH, Shim JS, et al. Rice NAC17 transcription factor enhances drought tolerance by modulating lignin accumulation [J]. Plant Sci, 2022, 323: 111404.

[31] Sun Y, Gu XY, Qu CF, et al. OsPUB75-OsHDA716 mediates deactivation and degradation of OsbZIP46 to negatively regulate drought tolerance in rice [J]. Plant Physiol, 2024, 197(1): kiae545.

[32] Liu J, Shi K, Wang SP, et al. MsCYP71 is a positive regulator for drought resistance in alfalfa [J]. Plant Physiol Biochem, 2023, 203: 107999.

[33] Johnson SM, Lim FL, Finkler A, et al. Transcriptomic analysis of *Sorghum bicolor* responding to combined heat and drought stress [J]. BMC Genom, 2014, 15(1): 456.

[34] Rao MJ, Xu YT, Tang XM, et al. CsCYT75B1, a Citrus CYTOCHROME P450 gene, is involved in accumulation of antioxidant flavonoids and induces drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. Antioxidants, 2020, 9(2): 161.

[35] Luo YH, Zhong JJ, Xiao H. Mechanism and engineering of endoplasmic reticulum-localized membrane protein folding in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Metab Eng, 2025, 90: 43-56.

[36] Brignac-Huber LM, Park JW, Reed JR, et al. Cytochrome P450 organization and function are modulated by endoplasmic reticulum phospholipid heterogeneity [J]. Drug Metab Dispos, 2016, 44(12): 1859-1866.

[37] Chong W, Shastri M, Eri R. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious nexus implicated in bowel disease pathophysiology [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(4): 771.

[38] Chen JS, Yap MC, Bassot A, et al. The ER thioredoxin-related transmembrane protein TMX2 controls redox-mediated tethering of ER-mitochondria contacts [J]. Cell Rep, 2025, 44(11): 116486.

[39] Ong G, Logue SE. Unfolding the interactions between endoplasmic reticulum stress and oxidative stress [J]. Antioxidants, 2023, 12(5): 981.

（责任编辑　张婷婷）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):103-112

大豆种皮色泽的QTL定位

李雅迁 冯龙哲 孙楠 张豪 张艺杰 杨雅琪 张欣宇 岳爱琴 杜维俊 王敏*

（山西农业大学农学院 农业农村部种质创新与分子育种重点实验室（部省共建） 山西省后稷实验室（杂粮生物育种山西实验室），太谷 030801）

摘 要： 【目的】种皮色泽是大豆重要的品质性状，通过对大豆种皮色泽相关性状进行QTL定位，挖掘相关基因位点，解析种皮色泽遗传效应，筛选关键候选基因，为培育品质优良的大豆品种提供参考依据。【方法】以栽培大豆品种晋大53为母本、野生大豆平南为父本杂交衍生的重组自交系群体（RIL）为材料，以籽粒的色泽度（L^*）、红绿值（a^*）和蓝黄值（b^*）为种皮色泽指标，结合前期SLAF标记构建的遗传图谱，采用复合区间作图法检测QTL，并结合SoyBase数据库和SoyMD数据库筛选候选基因。【结果】共定位10个种皮色泽相关的QTL，获得第8染色体663 kb和第9染色体370 kb 2个候选区段，分别包含11和6个候选基因。经转录组数据表达分析，Glyma.08G103900、Glyma.08G104100、Glyma.09G191200和Glyma.09G191700在籽粒中高表达且与种皮色泽相关，且在晋大53中表达量高于平南，确定为关键候选基因。【结论】在大豆中检测到2个一因多效QTL位点和4个QTL新位点。

关键词： 大豆；种皮色泽；重组自交系；QTL；候选基因

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0347

QTL Mapping for Seed Coat Color in Soybean

LI Ya-qian FENG Long-zhe SUN Nan ZHANG Hao ZHANG Yi-jie YANG Ya-qi ZHANG Xin-yu YUE Ai-qin DU Wei-jun WANG Min*

(*College of Agriculture, Shanxi Agricultural University*, *Key Laboratory of Germplasm Innovation and Molecular Breeding* (*Co-constructed by the Ministry and the Province*), *Ministry of Agriculture and Rural Affairs*, *Shanxi HouJi Laboratory* (*Shanxi Laboratory for Bio-breeding of Miscellaneous Cereals*), *Taigu* 030801)

Abstract: 【Objective】 Seed coat color is a key quality trait in soybean. Through QTL mapping for seed coat color-related traits, this study aims to identify associated genetic loci, clarify the genetic effects underlying seed coat color, screen for key candidate genes, and provide a reference for breeding high-quality soybean varieties. 【Method】 A recombinant inbred line (RIL) population derived from a cross between cultivated soybean Jinda 53 (female) and wild soybean Pingnan (male) was used. Seed coat color was evaluated using three parameters: lightness (L), red-green value (a*), and blue-yellow value (b*). A genetic map previously constructed with SLAF markers was employed, and QTL analysis was performed using composite interval mapping. Candidate genes were screened against the SoyBase and SoyMD databases. 【Result】 Ten QTLs associated with seed coat color were identified. Two candidate regions were obtained: a 663 kb interval on chromosome 8 and a 370 kb interval on chromosome 9, harboring 11 and 6 candidate genes, respectively. Transcriptome analysis revealed that Glyma.08G103900, Glyma.08G104100, Glyma.09G191200, and Glyma.09G191700 were highly expressed in seeds and were associated with seed coat color, showing higher expression levels in Jinda 53 than in Pingnan. These were thus identified as key candidate genes. 【Conclusion】 Two pleiotropic QTLs and four novel QTLs were identified in soybean.

收稿日期：2026-03-27

基金项目：山西省农业关键核心技术攻关子课题（NYGG27-04-01），山西省后稷实验室创新平台项目（202504010920003-2，2025011406020162），山西省现代农业产业技术体系建设项目（2025CYJSTX05-07）

*通信作者：王敏 wangmin3502@126.com

Keywords: soybean; seed coat color; recombinant inbred line; QTL; candidate gene

种皮色泽是大豆关键形态性状，与大豆种子商品质量和植株耐逆性等密切相关[1-3]。通过进化与演变，栽培大豆的种皮从最开始的黑种皮逐渐变得多元化，已具有黄色、绿色、黑色、褐色和双色等种皮颜色[4]。不同种皮颜色大豆籽粒中的营养成分与经济价值也存在显著差异[5-6]。当前大豆市场需求日趋多元化，深入探究不同种皮颜色大豆的开发与利用，对提升大豆种质资源利用价值、满足市场多元需求具有重要研究意义。

目前，国内外关于大豆种皮色泽的遗传与分子机制研究已有较多报道。邱红梅等[7]总结了大豆种皮色泽的遗传位点、关键基因和调控通路，明确类黄酮代谢途径是色素形成的核心生物学基础。Cho等[8]进一步揭示，种皮*CHS*基因可通过siRNA介导的转录后沉默调控种皮颜色，阐明了黄种皮形成的关键分子机制。现有研究已明确，*I*、*R*、*T*、*O*和*W1*这5个位点参与大豆种皮色泽性状的调控[9]。其中*I*、*R*和*T*位点主要通过控制色素的合成而调控大豆种皮颜色[10-11]。*I*位点能够调节花青素和原花青素的空间分布位置与沉积，抑制种皮整体的色素积累，使完全成熟种皮能够表现出黄色。而*I*位点则被定位在大豆的第8染色体上的一个富含查尔酮合成酶（chalcone synthase, CHS）的区域[12-13]。*T*和*R*位点能够通过控制原花青素和花青素的种类，进而控制种皮的局部颜色[14-15]，包括黑色（*i*、*R*、*T*）、不完全黑（i、R、t）、褐（*i*、*r*、*T*）和浅褐（*i*、*r*、*t*）[16-17]。也有研究发现，黑豆种皮中的花色苷色素主要是矢车菊素-3-单葡萄糖苷和飞燕草素-3-单葡萄糖苷，而天竺葵素-3-葡萄糖苷则是在某些特殊情况下才能产生[18]。*O*和*W1*位点只有在纯合隐性的*i r*和*i t*基因型中才能影响大豆种皮的颜色[10]，推测其为类黄酮代谢相关酶的调控因子。曹杰等[19]在第8染色体上定位到红色种皮相关候选区间。董全中等[20]发现A2染色体*I*位点自然突变是黄色种皮变为褐色的原因。Zhang等[21]研究表明种皮色泽能影响大豆含油量，克隆得到控制种皮色泽的*B1*基因，其C到T点突变是栽培大豆种皮从有泥膜转变为无泥膜的关键原因，且无泥膜种皮的种子油含量显著高于有泥膜种皮。Kim等[22]研究表明，种皮光泽度与表面结构、不饱和脂肪酸含量呈显著正相关。Wang等[23]利用栽培大豆与野生大豆杂交构建的重组自交系（RIL）群体，构建了高密度遗传图谱，检测到B1（泥膜）、G（种皮色）和I（种皮色抑制）等位点，并新鉴定出2个与泥膜相关的QTL。在表型鉴定方面，CIE $L^*a^*b^*$颜色体系被广泛应用，de Oliveira等[24]结合人工智能技术与CIE $L^*a^*b^*$颜色参数，通过机器学习模型实现了对绿粒大豆的精准分类，并建立了种子生理品质的预测模型。Sofi等[25]基于CIE $L^*a^*b^*$颜色系统对菜豆种皮颜色进行无损量化，能够快速、准确区分不同种质间的色泽差异。Sinnecker等[26]采用仪器测色（CIE Lab^*）和目测颜色2种方法，分析大豆种皮颜色与叶绿素含量之间的关系。王存虎等[27]采用CIELAB颜色体系对大豆种皮颜色进行量化，测定了L^*、a^*、b^*等颜色参数，并对表型变异进行分析，通过全基因组关联分析（genome-wide association study, GWAS），鉴定出与大豆种皮颜色显著关联的遗传位点，为大豆种皮色泽的遗传解析和分子育种提供了表型与遗传依据。

尽管现有研究已覆盖种皮色泽遗传位点、调控机制、评价方法等多个方向，但仍存在明显的研究短板。多数研究聚焦于单一栽培大豆材料或已知基因、位点的功能验证，针对栽培大豆与野生大豆杂交衍生群体的种皮色泽遗传研究较少，新QTL位点挖掘不足；同时，现有研究对种皮色泽遗传调控网络解析不够全面，针对不同年份、不同遗传背景下的色泽性状遗传规律研究尚不深入，难以全面支撑大豆种皮色泽分子育种工作。

本研究以栽培大豆品种晋大53为母本、野生大豆材料平南为父本杂交衍生的128个株系的RIL群体为试验材料，结合基于SLAF标记构建的高密度遗传连锁图谱，再以大豆籽粒的色泽度（L^*）、红绿值（a^*）和蓝黄值（b^*）作为种皮色泽指标，对2017年和2019年大豆种皮色泽进行QTL分析。发掘控制大豆种皮色泽的新QTL位点，为培育品质优良的大豆品种提供参考依据。

1　材料与方法

1.1　材料

以晋大53（山西农业大学选育的综合性状优良的大豆品种，种皮黄色，籽粒无泥膜）为母本，以平南（山西省平遥县采集的野生大豆，种皮黑色，籽粒有泥膜）为父本进行杂交，然后连续自交6代，株系内混合收获播种，获得由128个株系组成的RIL群体，该群体种皮色分离出多种变异类型，后代为黄色、褐色、棕色、双色和黑色一系列的中间类型，有的有泥膜，有的无泥膜，且泥膜覆盖深浅也有过渡类型，是种皮色泽遗传分析的理想群体。分别于2017年和2019年种植RIL群体，待植株成熟后收获种子进行性状测定。

1.2　方法

1.2.1　遗传图谱的构建　应用北京百迈科生物科技有限公司自主研发的SLAF-seq（specific-locus amplified fragment sequencing）技术[28]和High Map软件[29]对大豆128份重组自交系群体开发高密度分子标签，根据大豆参考基因组大小、GC含量，选择酶切方案。根据选定的酶切方案，分别对检测合格的各样品基因组DNA进行酶切试验。处理后选取质检合格的酶切片段（SLAF标签）进行测序。获得各个样品的reads，通过对reads进行评估，使用reads间聚类的方法，在亲本和子代中开发SLAF标签。最后利用多态性的SLAF标签，构建遗传图谱，并进行图谱评估。遗传图谱选用山西农业大学大豆种质创新与利用实验室前期对128份自交重组系群体构建的携带SLAF标签的遗传图谱[30]，该遗传图谱通过筛选出8 223个SLAF标签，以及山西农业大学大豆种质创新与利用实验室提供的可以比对到参考基因组上的SSR标记39个，共8 266个一起进行分群，最终获得一张包括20个连锁群共7 945个标记的连锁遗传图谱。

1.2.2　不同种皮色泽的测定　采用WSC-80C全自动色差计测量连续2年收获大豆的种皮颜色，每个品种随机选取5粒，用种皮的中间部分对准色差仪的集光孔进行测量，最后求平均值。用亨特标度法对L^*、a^*、b^*进行标定，在标准白板（Y=93.3）上进行测定。即色泽度L^*值、红绿值a^*和蓝黄值b^*[31]。当L^*值增加时，亮度逐渐增加。a^*值由小变大代表绿色的消减，红色的增强。同样，b^*值的增加证明蓝色在逐渐减弱，同时伴随着黄色的递增。色度根据公式：$C=1/2(a^*+b^*)$计算，式中，C^*值表示到亮度轴上的距离，即距离越远，C^*值越大[32]。

1.2.3　数据分析　采用Excel 2003进行数据整理和统计，利用SPSS对群体种皮色泽进行表型特征分析，使用Origin 2024软件进行正态分布性检验。利用ICIMapping软件对不同种皮的L^*、a^*、b^*等性状进行QTL定位，采用复合区间作图法进行分析，通过1 000次置换检验确定显著性水平（α=0.05）对应的LOD阈值，函数比值对数值大于2.5为确定QTL存在的依据，并制作LOD图；利用Mapchart2.2绘制定位结果的染色体定位图。QTL的命名方法：小写英文字母“q”开头，后面字母代表性状名称，中间数字为连锁群编号，最后数字为同一连锁群上控制同一性状的顺序编号。如：qL^*-1-1表示在第1染色体上控制种皮色泽度的第1个QTL。

1.2.4　候选基因分析　通过比较区间两端SSR标记的物理位置信息与大豆参考基因组，查询2个区间内的候选基因，并借助SoyBase网站的数据，分析候选基因的基因注释，从而初步锁定关键候选基因。

1.2.5　候选基因表达量分析　采用SoyMD在线网站（https://yanglab.hzau.edu.cn/）获得候选基因在籽粒中的表达量，确定候选基因。从Phytozome数据库中Glycine max Wm82.a2.v1版本获得候选基因的CDS序列，设计引物（附表1），通过RT-PCR验证候选基因在双亲中的表达量，使用GraphPad Prism软件绘制箱式图进行分析。

2　结果

2.1　大豆籽粒种皮色泽表型分析

通过对双亲2017年和2019年L^*、a^*和b^*等3个种皮色泽指标差异进行分析，结果显示，在2年中，从亲本各指标值看，父本与母本种皮色泽指数具有极显著差异，且晋大53的L^*、a^*和b^*的3个指标均显著高于平南（$P<0.01$）。从群体各项结果来看（表1），由于a^*值在各个品种之间数值差异比较大，导致其标准差明显偏大，接近均值，而L^*和b^*则标准差较小，分布相对均匀。群体的种皮色泽指数均值均介于双亲之间。所有性状的变幅最大值都超过了亲本，说明色泽相关性状在群体间有广泛的分离，表现出

表1 亲本及群体大豆种皮色泽的基本统计特征

Table 1 Basic statistical characteristics of soybean seed coat color in parental lines and the population

性状 Trait	年份 Year	亲本 Parents			群体 Population					
		晋大53 Jinda53	平南 Pingnan	显著性 Significance	均值±标准差 Mean±SD	变幅 Range	变异系数 CV(%)	峰度 Kurtosis	偏度 Skewness	广义遗传率 H^2(%)
光泽度 L*	2017	57.25±2.72	25.79±1.42	**	31.45±13.26	12.08–86.76	42	2.09	1.14	0.99
	2019	47.54±1.50	21.57±1.56	**	28.04±9.60	12.91–51.77	34	-0.72	0.25	
红绿值 a*	2017	10.07±0.83	1.38±0.278	**	5.93±5.74	-6.34–21.26	97	-0.40	0.46	0.98
	2019	10.02±0.50	3.06±0.50	**	6.12±4.56	-1.56–17.79	75	-0.81	0.39	
黄蓝值 b*	2017	29.67±2.52	6.4±0.82	**	15.80±10.07	0.85–34.27	64	-1.40	-0.05	0.99
	2019	27.85±1.52	3.43±0.50	**	14.07±9.71	-1.21–32.31	69	-1.36	-0.12	

注:**表示两个亲本的t检验差异极显著(P<0.01)。下同

Note: **indicates an extremely significant difference between the two parents based on the t-test (P<0.01). The same below

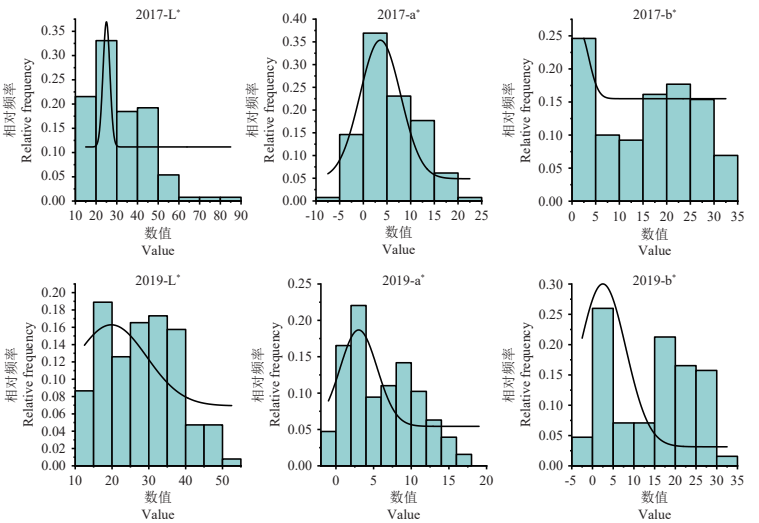


图1 大豆种皮色泽指数的频数分布直方图

Fig. 1 Histogram of frequency distribution of soybean seed coat color index

超亲分离现象。同时，a*的变异系数最大，且2年间变异系数存在一定差异，这可能与环境的影响有关。L*的变异系数小，说明种皮光泽度遗传较稳定。通过对大豆籽粒种皮色泽进行频率分布分析（图1），发现除了2017年的L*性状外，其他性状基本呈正态分布。广义遗传率均高于90%，说明这些性状主要由基因型决定，受环境影响小，育种选择可靠性高。综上所述，本群体种皮色泽的相关性状数据适合QTL定位。

2.2 大豆籽粒种皮色泽指标的相关性分析

通过对2017年和2019年大豆种质资源籽粒种皮色泽相关性状进行相关性分析（表2），结果显示，光泽度L*、红绿值a*、蓝黄值b*两两之间呈现极显著正相关关系，表明各个指标对大豆籽粒种皮色泽的影响是一致的。

2.3 大豆籽粒种皮色泽指标的QTL定位

采用复合区间作图法对2017年和2019年大豆籽粒的色泽相关性状L*、a*、和b*进行QTL分析，结果显示，2年共检测出10个与大豆籽粒色泽相关的QTL，分布于第1、8、9、17和19染色体。其中，有5个QTL位点在2017年和2019年均被检测到（图2和表3）。

从2年RIL群体中共检测到3个大豆籽粒光泽度

表2　RIL群体大豆种皮色泽相关性状间的相关分析

Table 2　Correlation analysis of soybean seed coat color related traits in RIL population

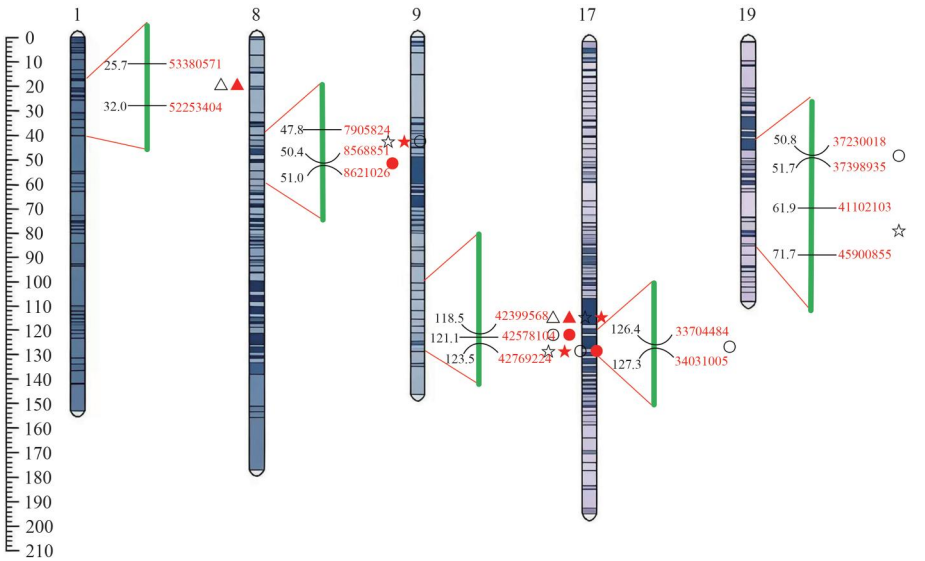
年份 Year	性状 Trait	光泽度 L*	红绿值 a*
2017	红绿值 a*	0.383**	
	蓝绿值 b*	0.778**	0.586**
2019	红绿值 a*	0.502**	
	蓝绿值 b*	0.949**	0.629**

L^*的QTL位点，分布在第8、9和19染色体上（表3）。单个QTL解释的表型变异概率范围为6.580%–39.077%。且3个QTL加性效应均为负值，说明与这个品质性状相关的QTL增效基因主要来自母本。*qL-8*位于第8染色体47.824–50.404 cM、7 905 824–8 568 851 bp，而*qL-9*位于第9染色体118.478–123.476 cM、42 399 568–42 769 224 bp，且在2年中均被检测到。*qL-19*只在2017年被检测到。*qL-8*的表型贡献率和LOD值最大，分别为39.077%和15.312。

从2年RIL群体中共检测到2个大豆籽粒红绿指标a^*的QTL位点，分布在第1和9染色体上，单个QTL解释的遗传变异范围为6.980%–35.021%。*qa-1*位于第1染色体25.748–32.014 cM、53 380 571–52 253 404 bp，*qa-9*位于第9染色体118.478–121.095 cM、42 399 568–42 578 104 bp，且在2年中均被检测到。该性状所有加性效应值均为负值，说明与其他位点的增效基因主要来自母本晋大53。

从2年RIL群体中共检测到5个大豆籽粒黄蓝指标b^*的QTL位点，分布在第8、9、17和19染色体上，单个QTL解释的表型变异概率范围为3.257%–45.822%。其中，只有*qb-9*位于第9染色体118.478–123.476 cM、42 399 568–42 769 224 bp，在2年中均被检测到，其余只在1年中被检测到。经加性效应分析，该性状所有加性效应值均为负值，说明与其他位点的增效基因主要来自母本晋大53。

通过对定位到的10个QTL进一步比较分析。结果表明，第8和9染色体为调控本群体种皮色泽的核心区域，其中，第9染色体共包含3个QTL，与经典*I*位点高度重合，同时控制L^*、a^*、b^* 3个性状，具有显著的多效性；而第8染色体作为另一主效区域，定位到3个稳定表达的QTL，同时控制L^*、b^* 2个性状，与已报道的*CHS*基因家族紧密连锁。另外，还鉴定到*qL-19*、*qa-1*、*qb-17*和*qb-19*新位点，丰富了大豆种皮色泽的遗传资源。



☆：2017年与L*相关QTL，△：2017年与a*相关QTL，○：2017年与b*相关QTL；★：2019年与L*相关QTL，▲：2019年与a*相关QTL，●：2019年与b*相关QTL

☆:L* related QTL in 2017, △: a* related QTL in 2017, ○: b* related QTL in 2017; ★:L* related QTL in 2019, ▲: a* related QTL in 2019, ●: b* related QTL in 2019

图2　大豆种皮色泽指数相关QTL在图谱上的位置

Fig. 2　Positions of QTL related to seed coat color index on the genetic map in soybean

表3 大豆籽粒色泽指数QTL分析

Table 3 QTL analysis of soybean seed color index

性状 Trait	QTL	位置 Position（cM）	位置区间 Location interval（cM）	物理距离 Physical distance（bp）	2017			2019		
					LOD	*PVE*（%）	Add	LOD	*PVE*（%）	Add
光泽度 L^*	*qL-8*	50	47.824–50.404	7 905 824–8 568 851	10.827	30.529	-6.952	15.312	39.077	-5.719
	qL-9	123	118.478–123.476	42 399 568–42 769 224	4.611	10.739	-4.138	5.913	12.806	-3.284
	qL-19	71	61.93–71.689	41 102 103–45 900 855	2.926	6.580	-3.224			
红绿值 a^*	*qa-1*	32	25.748–32.014	53 380 571–52 253 404	3.024	6.980	-1.548	5.933	13.106	-1.662
	qa-9	121	118.478–121.095	42 399 568–42 578 104	13.459	35.021	-3.490	12.192	30.376	-2.546
蓝黄值 b^*	*qb-8-1*	50	47.824–50.404	7 905 824–8 568 851	23.403	45.822	-6.574			
	qb-8-2	51	50.404–51.033	8 568 851–8 621 026				13.087	31.555	-5.088
	qb-9	123	118.478–123.476	42 399 568–42 769 224	10.129	15.674	-3.860	9.585	22.246	-4.289
	qb-17	127	126.428–127.29	33 704 484–34 031 005	2.556	3.257	-1.747			
	qb-19	51	50.841–51.66	37 230 018–37 398 935	3.244	4.201	-2.008			

2.4 候选基因预测分析

发掘出2个候选区间，分别位于第8染色体的物理区间7 905 824–8 568 851 bp，以及第9染色体的物理区间42 399 568–42 769 224 bp。根据定位结果，经SoyBase分析，在第8染色体定位区间约663 kb内有84个基因，根据功能注释筛选出11个与种皮相关的候选基因（表4）。在第9染色体定位区间370 kb内有41个基因，筛选出6个与种皮相关的候选基因（表5）。

通过分析候选基因在籽粒中的表达情况，结果显示，第8染色体的Glyma.08G103900、Glyma.08G104100、Glyma.08G109300、Glyma.08G109400和Glyma.08G109500在种子中呈现为中高度表达，其中，Glyma.08G103900表达量最高，Glyma.08G104100表达次之，但样本间特异性较强；其余6个基因几乎无表达（图3-A）。而第9染色体的Glyma.09G191200和Glyma.09G191700呈高度表达，其中，Glyma.09G191700表达量最高，Glyma.09G191200表达次之，但特异性较强；其余4个基因几乎无表达（图3-B）。经RT-PCR分析（图3-C），发现4个候选基因在晋大53中均呈现一致的正向上调表达模式，其中，Glyma.09G191200的表达极显著高于平南（$P<0.01$），其余3个基因在晋大53中的表达也显著高于平南。推测以上4个基因可能共同参与调控晋大53的特异性优良性状。综上，推测第8染色体的Glyma.08G103900和Glyma.08G104100，以及第9染色体的Glyma.09G191200和Glyma.09G191700是与种子色泽显著相关的候选基因，可作为后续功能验证的优先选择。对比亲本重测序数据，这4个候选基因在外显子上均存在SNP变异，且均为非同义突变，变异发生于亲本平南（表6）。

3 讨论

种皮色泽是大豆重要的外观品质性状，其遗传机制解析对品种改良具有重要意义。宋健等[33]构建了大豆巢式关联作图（NAM）群体，通过测定种皮色CIE $L^*a^*b^*$参数（L^*=26.85–88.92，a^*=-17.16–16.28）开展QTL定位，将大豆花色主效QTL定位在第13染色体*qFC13-1*位点，该位点与已知花色调控基因*W1*位点一致；同时共鉴定到12个与大豆种皮色相关的遗传位点，其中8个为新位点。栽培大豆与一年生野生大豆杂交后代分离丰富，是开展种皮色泽遗传定位的优良群体，已有研究挖掘出多个类黄酮代谢相关的QTL[7]。栽培大豆与野生大豆杂交群体中鉴定到的*CHS*基因家族位于第8染色体*I*位点区域，该区域在栽培和野生大豆间存在明显的结构变异[14]。但野生大豆籽粒多具泥膜，会遮盖种皮影响光泽与表型鉴定，且泥膜与种皮色独立遗传。目前，对种皮光泽的研究主要集中在*B1*基因的克隆和功能验证，但光泽形成的生化机制尚不完全清楚[21]。Song等[34]进一步采用多组学策略，结合分离群体混合分组分析（bulked segregant analysis, BSA）、GWAS与转录组分析，从L^*、a^*、b^*等颜色参数入手，将大豆种皮色相关位点主要定位在第6、8和9染色体，

表4　第8染色体定位的基因与注释

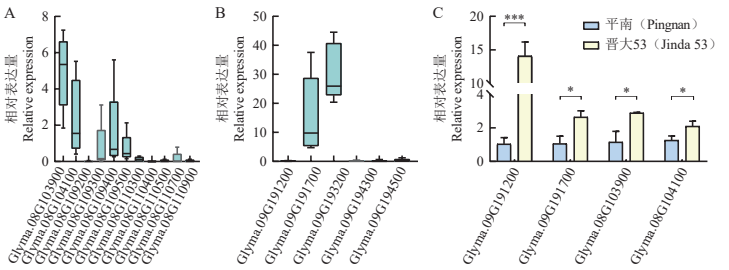
Table 4　Genes located on chromosome 8 and their annotations

基因名称 Gene name	染色体位置 Chromosome location (bp)	注释描述 Annotation description	已报道基因 Reported gene	参考文献 Reference
Glyma.08g103900. Wm82.a2.v1	7 970 507–7 974 378	Flavonoid 3′,5′-methyltransferase		
Glyma.08g104100. Wm82.a2.v1	7 993 317–7 995 690	Flavonol biosynthesis Flavonoid biosynthesis (in equisetum) Leucopelargonidin and leucocyanidin biosynthesis Flavonoid 3′-monooxygenase		
Glyma.08g109200. Wm82.a2.v1	8 384 742–8 386 542	Flavonoid biosynthetic process	*CHS4*	[7, 14]
Glyma.08g109300. Wm82.a2.v1	8 387 509–8 391 327	Flavonoid biosynthesis (in equisetum) Flavonoid biosynthesis		
Glyma.08g109400. Wm82.a2.v1	8 391 364–8 394 840	Flavonoid biosynthetic process Flavonoid biosynthesis (in equisetum) Flavonoid biosynthesis		
Glyma.08g109500. Wm82.a2.v1	8 397 944–8 399 751	Flavonoid biosynthesis (in equisetum) Flavonoid biosynthesis	*CHS1*	[7]
Glyma.08g110300. Wm82.a2.v1	8 475 793–8 477 410	Flavonoid biosynthetic process Flavonoid biosynthesis (in equisetum) Flavonoid biosynthesis	*CHS3*	[7–8]
Glyma.08g110400. Wm82.a2.v1	8 478 834–8 480 215	Flavonoid biosynthesis (in equisetum) Flavonoid biosynthesis		
Glyma.08g110500. Wm82.a2.v1	8 504 479–8 506 020	Flavonoid biosynthesis (in equisetum) Flavonoid biosynthesis		
Glyma.08g110700. Wm82.a2.v1	8 513 952–8 515 719	Flavonoid biosynthesis (in equisetum) Flavonoid biosynthesis		
Glyma.08g110900. Wm82.a2.v1	8 517 799–8 519 303	Flavonoid biosynthesis (in equisetum) Flavonoid biosynthesis		

表5　第9染色体定位的基因与注释

Table 5　Genes located on chromosome 9 and their annotations

基因名称 Gene name	染色体位置 Chromosome location (bp)	注释描述 Annotation description
Glyma.09G190700. Wm82.a2.v1	41 541 780–41 545 610	Leucocyanidin biosynthesis
Glyma.09G191200. Wm82.a2.v1	41 587 926–41 592 094	Flavonol biosynthesis Flavonoid short-chain dehydrogenase
Glyma.09G191700. Wm82.a2.v1	41 642 568–41 650 351	Flavonoid biosynthetic process
Glyma.09G193200. Wm82.a2.v1	41 775 058–41 777 851	Flavonol biosynthesis
Glyma.09G194300. Wm82.a2.v1	41 867 600–41 868 959	Flavonoid biosynthetic process
Glyma.09G194500. Wm82.a2.v1	41 877 781–41 882 626	Leucocyanidin biosynthesis



A:第8染色体候选基因大豆种子相对表达量;B:第9染色体候选基因大豆种子相对表达量;C:候选基因在双亲中的表达分析;所示数据为平均数±方差,平南和晋大53显著性差异使用*t*检验分析,*表示*P*<0.05,***表示*P*<0.001

A: The relative expression level of the candidate gene on chromosome 8 in soybean seeds. B: The relative expression level of the candidate gene on chromosome 9 in soybean seeds. C: Expression analysis of candidate genes in the parents. Data are presented as mean ± variance, significant differences between Pingnan and Jinda 53 were assessed by *t*-test, * indicating *P*<0.05 and *** indicating *P*<0.001

图3 候选基因在大豆种子及双亲中相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of candidate genes in soybean seeds and both parents

表6 候选基因在亲本间不同的SNP差异类型

Table 6 Different types of SNP differences between the parents for candidate genes

基因名称 Gene name	单碱基 Single base	变异亲本 Variant parent
Glyma.08G103900	A/T	平南
Glyma.08G104100	T/C，G/A	平南,平南
Glyma.09G191200	G/T，A/G	平南,平南
Glyma.09G191700	A/T	平南

其中，第8染色体的*I*位点、第6染色体的*T*位点、第9染色体的*R*位点为调控种皮色的关键主效位点，并在关键区间内筛选获得182个差异表达候选基因。本研究定位的*qL-8*、*qb-8-1*和*qb-8-2*与*I*位点位置重叠，均抑制花青素合成[34]。Yuhazu等[35]进一步揭示了该位点因大片段缺失导致功能丧失、种皮由黄变褐的分子机制，为本研究定位的蓝黄值提供了解释，同时影响了种皮的光泽度。而定位的*qL-9*、*qa-9*和*qb-9*与已知的*R*位点区域重叠。*R*位点已被证实为编码R2R3 MYB转录因子，其功能正常时促进黑色种皮形成，功能丧失时则会形成褐色种皮[36]，这与该位点调控黑/褐色种皮的功能相一致，且该位点影响种皮光泽度，表现出一因多效。与传统定性性状定位相比，本研究的数量性状定位具有明显优势：采用连续数值检测色素积累；可分别定位影响L^*、a^*、b^*的QTL，实现多组分解析。

Vuong等[37]推测种皮的色泽度与花青素及类黄酮代谢有关。已有研究报道在该位置定位到种皮颜色的QTL[38]。关键染色体区段候选基因分析表明，第8和9染色体区域的候选基因均呈现出明显的表达差异，说明种子发育过程中存在严格的转录调控机制。从功能注释来看，Glyma.08G103900编码黄酮类化合物3′,5′-甲基转移酶，参与黄酮合成过程中的甲基化反应；Glyma.08G104100不仅参与黄酮整体合成，还调控白花菜苷和白花青素的合成，并具有黄酮3′-单加氧酶活性。两者均位于第8染色体，可能在黄酮代谢通路中存在相互作用。而在第9染色体上，Glyma.09G191200属于黄酮短链脱氢酶，直接参与黄酮化合物的合成；Glyma.09G191700则主要参与黄酮类的生物合成过程，两者均位于第9染色体，共同参与黄酮类物质的合成代谢，影响大豆黄酮及相关代谢物的积累。表明种皮色泽主要受黄酮类物质和花青素种类的影响。以上4个基因在优良种质晋大53中表现出上调的表达特征，推测其可能受到共同上游转录因子的调控，参与同一生物学响应通路。其中Glyma.09G191200表达响应最高、差异达到极显著水平，可优先作为核心关键表型候选基因。

结果进一步证实，大豆种皮色泽以类黄酮生物合成途径为核心调控通路，该结论与邱红梅等[7]总结的种皮色泽遗传调控规律一致，验证了本结果的可靠性。Cho等[8]报道的siRNA沉默机制，能够高效抑制*CHS*基因表达，进而阻断色素合成，为本研究种皮色泽差异形成提供了理论依据。Wang

等[39]通过转录组与共表达网络分析成功挖掘种皮色泽相关基因，证明了多组学联合分析在候选基因筛选中的准确性，也证实了本研究结果的科学性。另外，Zhang等[21]提出种皮性状与油脂含量存在协同调控，表明种皮色泽相关基因可能同时参与外观与品质形成，为本研究开展大豆综合性状改良提供了新思路。

4　结论

RIL群体种皮色泽呈数量遗传，各指标均值均介于双亲之间。a^*值变异较大，且L^*、a^*、b^*间呈极显著正相关。共检测到10个QTL、其中第9染色体上的*qL-9*、*qa-9*、*qb-9*及第8染色体上的*qL-8*和*qb-8-1*和*qb-8-2*位置相近，表现出一因多效。筛选出4个高表达候选基因，均在晋大53中正向表达，以Glyma.09G191200表达最高。

文章所有附表数据请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260824155818_NewsFile_58.pdf）。

参考文献

[1] Qutob D, Ma FS, Peterson CA, et al. Structural and permeability properties of the soybean seed coat [J]. Botany, 2008, 86(3): 219-227.

[2] Le BH, Wagmaister JA, Kawashima T, et al. Using genomics to study legume seed development [J]. Plant Physiol, 2007, 144(2): 562-574.

[3] 丁然. 基于随机森林大豆籽粒外观品质识别系统的设计与实现 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.
Ding R. Design and implementation of soybean grain appearance quality distinguish system based on random forests [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2015.

[4] 赵团结, 盖钧镒. 栽培大豆起源与演化研究进展 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(7): 954-962.
Zhao TJ, Gai JY. The origin and evolution of cultivated soybean *Glycine max* (L.) merr. [J]. Sci Agric Sin, 2004, 37(7): 954-962.

[5] 吴谷丰, 张晓燕, 黄璐, 等. 不同种皮颜色大豆籽粒和芽菜营养品质与抗氧化活性分析 [J]. 江苏农业学报, 2026, 42(1): 186-198.
Wu GF, Zhang XY, Huang L, et al. Analysis of nutritional quality and antioxidant activity in soybean seeds and sprouts with different seed coat colors [J]. Jiangsu J Agric Sci, 2026, 42(1): 186-198.

[6] 吴采玉, 文春雨, 黄丽萍, 等. 不同颜色大豆种皮成分及抗氧化性分析 [J]. 大豆科学, 2023, 42(5): 554-564.
Wu CY, Wen CY, Huang LP, et al. Analysis of seed coat composition and antioxidant activity of soybean with different colors [J]. Soybean Sci, 2023, 42(5): 554-564.

[7] 邱红梅, 陈亮, 侯云龙, 等. 大豆种子颜色遗传调控机制研究进展 [J]. 作物学报, 2021, 47(12): 2299-2313.
Qiu HM, Chen L, Hou YL, et al. Research progress on genetic regulatory mechanism of seed color in soybean (*Glycine max*) [J]. Acta Agron Sin, 2021, 47(12): 2299-2313.

[8] Cho YB, Jones SI, Vodkin LO. Mutations in *Argonaute5* illuminate epistatic interactions of the *K1* and *I* loci leading to saddle seed color patterns in *Glycine max* [J]. Plant Cell, 2017, 29(4): 708-725.

[9] Endrizzi J E, Turcotte E L, Kohel R J. Qualitative genetics, cytology, and cytogenetics [J]. Cotton Agronomy Monograph, 1984, 419(5): 137-214.

[10] Bernard R L, Weiss M G. Qualitative genetics, in soybean: improvement, production and uses [J]. Plant Mol Biology, 1973, 56 (1): 117-149.

[11] Dashiell K. SOYBEANS: improvement, production, and uses. third edition [J]. Agric Syst, 2005, 83(1): 110-111.

[12] Nicholas CD, Lindstrom JT, Vodkin LO. Variation of proline rich cell wall proteins in soybean lines with anthocyanin mutations [J]. Plant Mol Biol, 1993, 21(1): 145-156.

[13] Clough SJ, Tuteja JH, Li M, et al. Features of a 103-kb gene-rich region in soybean include an inverted perfect repeat cluster of *CHS* genes comprising the *I* locus [J]. Genome, 2004, 47(5): 819-831.

[14] Tuteja JH, Clough SJ, Chan WC, et al. Tissue-specific gene silencing mediated by a naturally occurring *Chalcone* synthase gene cluster in *Glycine max* [J]. Plant Cell, 2004, 16(4): 819-835.

[15] Toda K, Yang DJ, Yamanaka N, et al. A single-base deletion in soybean flavonoid 3′-hydroxylase gene is associated with gray pubescence color [J]. Plant Mol Biol, 2002, 50(2): 187-196.

[16] Buzzell RI, Buttery BR, MacTavish DC. Biochemical genetics of black pigmentation of soybean seed [J]. J Hered, 1987, 78(1): 53-54.

[17] Todd JJ, Vodkin LO. Pigmented soybean (*Glycine max*) seed coats accumulate proanthocyanidins during development [J]. Plant Physiol, 1993, 102(2): 663-670.

[18] Lee JH, Kang NS, Shin SO, et al. Characterisation of anthocyanins in the black soybean (*Glycine max* L.) by HPLC-DAD-ESI/MS analysis [J]. Food Chem, 2009, 112(1): 226-231.

[19] 曹杰, 谷勇哲, 洪慧龙, 等. 大豆红色种皮的色素鉴定和基因定位 [J]. 中国农业科学, 2023, 56(14): 2643-2659.
Cao J, Gu YZ, Hong HL, et al. Pigment identification and gene mapping in red seed coat of soybean [J]. Sci Agric Sin, 2023, 56 (14): 2643-2659.

[20] 董全中, 蒋炳军, 张勇, 等. 大豆褐色种皮遗传分析及基因定

位 [J]. 大豆科学, 2020, 39(3): 361-369.
Dong QZ, Jiang BJ, Zhang Y, et al. Inheritance analysis and gene mapping of brown seed coat in soybean [J]. Soybean Sci, 2020, 39 (3): 361-369.

[21] Zhang DJ, Sun LJ, Li S, et al. Elevation of soybean seed oil content through selection for seed coat shininess [J]. Nat Plants, 2018, 4(1): 30-35.

[22] Kim SL, Chi HY, Son JR, et al. Physicochemical characteristics of soybean seed coat and their relationship to seed lustre. Korean J Crop Sci, 2005, 50(spe): 123-131.

[23] Wang WB, Liu MF, Wang YF, et al. Characterizing two inter-specific Bin maps for the exploration of the QTLs/genes that confer three soybean evolutionary traits [J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 1248.

[24] de Oliveira VR, Souza NOS, da Silva Arantes M, et al. Artificial intelligence applied to the classification of greenish seeds and prediction of physiological quality in soybean [J]. Ciênc Agrotec, 2024, 48: e003624.

[25] Sofi P, Khalid R, Shafi S, et al. A low cost and high throughput spectroscopic method for quantification of seed coat colour differences in plain seeded bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm from Western Himalayan Kashmir [M]. Durham:Research Square, 2022.

[26] Sinnecker P, Gomes MSO, Arêas JAG, et al. Relationship between color (instrumental and visual) and chlorophyll contents in soybean seeds during ripening [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(14): 3961-3966.

[27] 王存虎, 许潇, 许锐能, 等. 基于CIELAB的大豆种皮颜色全基因组关联分析 [J]. 大豆科学, 2024, 43(6): 674-682.
Wang CH, Xu X, Xu RN, et al. Genome-wide association study of soybean seed coat color based on CIELAB [J]. Soybean Sci, 2024, 43(6): 674-682.

[28] Sun XW, Liu DY, Zhang XF, et al. SLAF-seq: an efficient method of large-scale *de novo* SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing [J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58700.

[29] Liu DY, Ma CX, Hong WG, et al. Construction and analysis of high-density linkage map using high-throughput sequencing data [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98855.

[30] 陈奕博, 杨万明, 岳爱琴, 等. 基于SLAF标记的大豆遗传图谱构建及苗期耐盐性QTL定位 [J]. 生物技术通报, 2023, 39(2): 70-79.
Chen YB, Yang WM, Yue AQ, et al. Construction of soybean genetic map based on SLAF markers and QTL mapping analysis of salt tolerance at seedling stage [J]. Biotechnol Bull, 2023, 39(2): 70-79.

[31] Cho MH, Park HL, Park JH, et al. Characterization of regiospecific flavonoid 3′/5′-O-methyltransferase from tomato and its application in flavonoid biotransformation [J]. J Korean Soc Appl Biol Chem, 2012, 55(6): 749-755.

[32] 白新祥, 胡可, 戴思兰, 等. 不同花色菊花品种花色素成分的初步分析 [J]. 北京林业大学学报, 2006, 28(5): 84-89.
Bai XX, Hu K, Dai SL, et al. Components of flower pigments in the petals of different color *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cultivars [J]. J Beijing For Univ, 2006, 28(5): 84-89.

[33] 宋健, 熊亚俊, 陈伊洁, 等. 大豆巢式关联作图(NAM)群体构建及花色和种皮色遗传分析 [J]. 作物学报, 2024, 50(3): 556-575.
Song J, Xiong YJ, Chen YJ, et al. Genetic analysis of seed coat and flower color based on a soybean nested association mapping population [J]. Acta Agron Sin, 2024, 50(3): 556-575.

[34] Song J, Xu RX, Guo QY, et al. An omics strategy increasingly improves the discovery of genetic loci and genes for seed-coat color formation in soybean [J]. Mol Breeding, 2023, 43(9): 71.

[35] Yuhazu M, Higuchi Y, Kanazawa A, et al. Large deletions including inverted repeats of the pseudo *CHS* gene in seed-coat-pigmented mutants derived from Japanese yellow soybean cultivars [J]. Breed Sci, 2025, 75(4): 334-338.

[36] Gillman JD, Tetlow A, Lee JD, et al. Loss-of-function mutations affecting a specific *Glycine max* R2R3 MYB transcription factor result in brown hilum and brown seed coats [J]. BMC Plant Biol, 2011, 11(1): 155.

[37] Vuong TD, Sonah H, Meinhardt CG, et al. Genetic architecture of cyst nematode resistance revealed by genome-wide association study in soybean [J]. BMC Genom, 2015, 16: 593.

[38] Zhou ZK, Jiang Y, Wang Z, et al. Resequencing 302 wild and cultivated accessions identifies genes related to domestication and improvement in soybean [J]. Nat Biotechnol, 2015, 33(4): 408-414.

[39] Wang C, Fu PC, Sun TT, et al. Identifying candidate genes related to soybean (*Glycine max*) seed coat color via RNA-seq and coexpression network analysis [J]. Genes, 2025, 16(1): 44.

（责任编辑　李楠）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):113-123

甘薯*IbBADH*基因家族全基因组鉴定与*IbBADH1a*上游转录调控因子筛选

周广立[1,2] 陈锦钗[1,2] 李鑫鑫[1,2] 武小平[3] 贾峥嵘[4] 阎昊[4] 贺立恒[1,2*]
贾小云[2,5*]

（1.山西农业大学农学院，太谷 030801；2.山西省特用作物遗传和代谢工程研究中心，太谷 030801；3.山西农业大学玉米研究所，忻州 034000；4.山西农业大学高粱研究所，晋中 030600；5.山西农业大学生命科学学院，太谷 030801）

摘 要：【目的】对甘薯（*Ipomoea batatas* (L.) Lam.）甜菜碱醛脱氢酶（*IbBADH*）基因家族进行全基因组鉴定，分析其结构、进化及表达特征，并以*IbBADH1a*启动子为诱饵筛选逆境响应调控因子，为解析*IbBADH*介导的逆境响应网络奠定基础。【方法】基于甘薯基因组鉴定*IbBADH*家族成员，分析基因结构、系统发育关系及启动子顺式元件。结合转录组数据分析表达模式，克隆*IbBADH1a*启动子，构建pAbAi诱饵载体，利用酵母单杂交（Y1H）筛选甘薯块根cDNA文库，获得候选结合蛋白并进行点对点验证。【结果】鉴定到6个*IbBADH*成员。理化性质显示，IbBADH蛋白均呈酸性，不稳定指数均小于40，属亲水性蛋白，且预测主要定位于叶绿体。种内共线性分析检测到10对涉及*IbBADH*基因的片段重复基因对。种间共线性分析显示*IbBADH*基因与旋花科近缘种存在广泛的共线性关系。系统发育分析表明，IbBADH与旋花科BADH聚为4个类群。启动子分析显示，*IbBADH*家族成员启动子区域内富含逆境、激素响应顺式作用元件。表达模式分析表明，*IbBADH1a*在所有样本中表达水平最高。Y1H筛选获得4个逆境响应调控因子（BTF3、TSJT1、bHLH49、ERF073），点对点验证证实其均能与*IbBADH1a*启动子特异性结合。【结论】甘薯*IbBADH*家族成员在结构域与基因结构层面总体保守，其启动子富集逆境、激素响应相关顺式作用元件。*IbBADH1a*启动子受BTF3、TSJT1、bHLH49、ERF073调控，为解析*IbBADH1a*转录调控网络及抗逆相关机制提供了重要线索。

关键词： 甘薯；甜菜碱醛脱氢酶；顺式作用元件；酵母单杂交；互作蛋白

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0119

Genome-wide Identification of the *IbBADH* Gene Family and Screening of Upstream Transcriptional Regulators of *IbBADH1a* in Sweetpotato

ZHOU Guang-li[1,2] CHEN Jin-chai[1,2] LI Xin-xin[1,2] WU Xiao-ping[3] JIA Zheng-rong[4] Yan Hao[4] HE Li-heng[1,2*]
JIA Xiao-yun[2,5*]

（1. *College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu* 030801; 2. *Shanxi Engineering Research Center for Genetics and Metabolism of Special Crops, Taigu* 030801; 3. *Maize Research Institute, Shanxi Agricultural University, Xinzhou* 034000; 4. *Sorghum Research Institute, Shanxi Agricultural University, Jinzhong* 030600; 5. *College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu* 030801）

Abstract:【Objective】The purpose of this study was to perform genome-wide identification of the betaine aldehyde dehydrogenase (*IbBADH*) gene family in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), analyze its structure, evolution, and expression characteristics, and use the *IbBADH1a* promoter as bait to screen for stress response regulators, laying a foundation for analyzing the *IbBADH*-mediated stress response network.【Method】The *IbBADH* family members were identified based on the sweetpotato genome, and the gene structure, phylogenetic relationship,

收稿日期：2026-01-26
基金项目：中央引导地方科技发展资金项目（YDZJSX2024B007），山西省科技合作与交流专项（202304041101009），山西省现代农业产业技术体系建设专项（2025CYJSTX06-04/22），山西农业大学科技创新提升工程（CXGC2025023）
*通信作者：贺立恒 sxndhlh@163.com，贾小云 jiaxiaoyun@sxau.edu.cn

and promoter *cis*-elements were analyzed. The expression pattern was analyzed using transcriptome data, the *IbBADH1a* promoter was cloned, and the pAbAi bait vector was constructed. The sweetpotato root cDNA library was screened by yeast one-hybrid (Y1H) to obtain candidate binding proteins and perform point-to-point verification. 【Result】 Six *IbBADH* members were identified. The physicochemical properties showed that IbBADH protein was acidic, and the instability index was less than 40, indicating that the protein was hydrophilic, and it was predicted to be mainly located in chloroplasts. Intraspecific colinearity analysis detected 10 pairs of segmental duplication gene pairs involving the *IbBADH* gene. Interspecific collinearity analysis showed that the *IbBADH* gene showed extensive collinearity with related species of the Convolvulaceae family. Phylogenetic analysis showed that IbBADH and BADH proteins from Convolvulaceae clustered into four groups. Promoter analysis showed that the promoter regions of *IbBADH* family members were rich in stress and hormone response *cis*-acting elements. The expression pattern analysis indicates that *IbBADH1a* has the highest expression level among all the samples. Four stress response regulators (BTF3, TSJT1, bHLH49, ERF073) were obtained by Y1H screening, and point-to-point verification confirmed that they could specifically bind to the *IbBADH1a* promoter. 【Conclusion】 The *IbBADH* family members of sweetpotato are generally conserved at the level of domain and gene structure, and their promoters are rich in *cis*-acting elements related to stress and hormone response. The *IbBADH1a* was regulated by BTF3, TSJT1, bHLH49 and ERF073, and provide important clues for the analysis of *IbBADH1a* transcriptional regulatory network and stress resistance related mechanisms.

Keywords: sweetpotato; betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH*); *cis*-acting element; yeast one-hybrid; interacting proteins

甜菜碱醛脱氢酶（betaine aldehyde dehydrogenase, BADH）属于醛脱氢酶（aldehyde dehydrogenase, ALDH）超家族，是植物渗透调节相关代谢途径中的关键酶之一。*BADH*在植物中的克隆及酶学研究最初在菠菜（*Spinacia oleracea*）中开展[1]。此后，在水稻（*Oryza sativa*）[2]（3个成员）、拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）[3]（2个成员）、藜麦（*Chenopodium quinoa*）[4]（3个成员）等多种植物中陆续鉴定到*BADH*基因家族成员，而在甘薯中，该家族的系统鉴定及其调控机制研究仍相对有限。

*BADH*在植物中有多重生物学功能[5]。作为高等植物中甘氨酸甜菜碱（glycine betaine, GB）生物合成路径中的关键酶基因之一[6]，*BADH*可响应渗透胁迫、高盐、干旱及重金属等非生物胁迫，通过渗透调节、活性氧清除与抗氧化稳态维持等过程提高植物逆境适应能力[7-8]。在可积累GB的物种中，BADH催化甜菜碱醛氧化生成GB，是GB合成途径中的关键限速步骤之一。GB作为典型渗透保护剂，有助于维持渗透稳态并稳定蛋白质与膜结构，从而缓解逆境胁迫造成的伤害[8]。非生物胁迫下，*BADH*通常表现出诱导表达或酶活增强的响应特征。例如，渗透胁迫可提高大麦*BADH*基因的转录水平[9]；在干旱和盐胁迫下，玉米体内BADH酶活性提高并促进GB积累[10]；重金属胁迫可诱导*BADH*基因表达上调，并伴随抗氧化基因的协同增强[11]；外源多巴胺处理通过诱导*TyrDC*基因表达促进内源多巴胺积累，进而上调*BADH*基因表达[12]。通过基因工程手段提高*BADH*基因表达水平，已被认为是提升作物耐受非生物胁迫的可行策略[13]。*BADH*基因已在多种植物中实现遗传转化，转基因植株的耐逆性普遍提升，并伴随生理生化指标改善，包括小麦（*Triticum aestivum*）[14]、烟草（*Nicotiana tabacum*）[15]、马铃薯（*Solanum tuberosum*）[16]及大豆（*Glycine max*）[17]等。转基因*BADH*植株在逆境胁迫下常伴随一系列生理改善：存活率与种子萌发率提高[18]；幼苗鲜重、株高、根长及相对含水量增加[19]；抗氧化酶系统活性增强[20]；叶绿素含量维持较高水平并减缓光合效率的下降[21]；内源GB含量积累[22]。许多转基因品系在逆境下耐受性提高与GB积累密切相关[23]。

甘薯（*Ipomoea batatas*（L.）Lam.）是全球重要的块根作物之一[24]，兼具粮食、饲料和工业原料等多重用途，在保障粮食安全和推动农业可持续发展中具有重要地位[25]。生长过程中常面临干旱、盐渍和低温等多种非生物胁迫，严重制约产量与品质[26]。因此，系统解析甘薯*IbBADH*基因家族的组成特征及潜在互作逆境响应调控因子，对甘薯抗逆性的分子改良具有重要意义。

本研究对甘薯*IbBADH*基因家族开展了系统鉴定与分析，并以*IbBADH1a*启动子为诱饵从甘薯块根

cDNA酵母文库中筛选其潜在上游转录调控因子，为解析甘薯*IbBADH*基因在抗逆中的潜在功能和作用机制提供理论基础，也为培育逆境适应性甘薯新材料提供靶标。

1　材料与方法

1.1　材料

本研究以甘薯品种‘徐薯18号’（XS18，中国农科院甘薯研究中心提供）的健康叶片为材料，用于基因组DNA提取。酵母单杂交（yeast one-hybrid, Y1H）诱饵载体pAbAi购自青岛欧易生物科技有限公司。

商品化培养基与试剂：MS培养基、LB培养基、YNB基础培养基、SD缺陷型培养基（-Ura、-Leu）、YPDA培养基及Aureobasidin A（AbA）均购自北京酷来博科技有限公司。

自配试剂与培养基：40%（w/v）葡萄糖溶液：称取40 g葡萄糖，加蒸馏水溶解并定容至100 mL，115 ℃灭菌15 min，4 ℃保存备用。0.2%（w/v）腺嘌呤半硫酸盐溶液：称取0.2 g腺嘌呤半硫酸盐，加蒸馏水溶解并定容至100 mL，使用0.22 μm滤膜过滤除菌，4 ℃保存备用。0.9%（w/v）NaCl溶液：称取0.9 g NaCl，加蒸馏水溶解并定容至100 mL，121 ℃高压灭菌20 min，4 ℃保存备用。10×TE缓冲液：取5 mL 1 mol/L Tris-HCl（pH 8.0）与1 mL 0.5 mol/L EDTA（pH 8.0），用蒸馏水定容至50 mL，调节pH至7.5，121 ℃高压灭菌20 min后备用。YPDA液体培养基（100 mL）：称取酵母提取物1 g与蛋白胨2 g，加蒸馏水定容至93.5 mL，调节pH至6.5；121 ℃灭菌20 min，冷却至55 ℃及以下后，加入5 mL 40%葡萄糖溶液与1.5 mL 0.2%腺嘌呤半硫酸盐溶液，混匀。缺陷型筛选培养基：SD/-Ura与SD/-Leu均需配制固体和液体2种形式。在相应固体培养基的基础上，根据实验需求加入不同浓度的AbA，即可配制含AbA的筛选培养基。

1.2　方法

1.2.1　甘薯*IbBADH*家族成员鉴定与染色体定位　从TAIR数据库（https://www.arabidopsis.org/）下载拟南芥BADH蛋白序列；甘薯‘XS18’的基因组序列及基因结构注释文件获取自Plant GARDEN数据库（https://plantgarden.jp/en/index）。采用NCBI BLAST+（v2.9.0）（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）进行同源序列检索。以拟南芥BADH蛋白序列为查询序列，对甘薯本地蛋白数据库进行BLASTP比对，采用BLOSUM62矩阵，E-value阈值设为1e-5，保留可信匹配序列用于后续分析。利用NCBI Conserved Domain Search（CDD，https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi）验证候选蛋白是否包含BADH蛋白相关保守结构域（PLN02467）。剔除缺失或不完整结构域序列，最终确定*IbBADH*家族成员。

为确定甘薯*IbBADH*家族成员在染色体上的分布，从甘薯基因组序列文件中提取各染色体长度，基于基因组注释信息提取所有*BADH*成员的染色体位置信息，利用TBtools绘制*IbBADH*基因在同源染色体群上的物理分布图[27]。基于甘薯六倍体特征，按照基因所在的同源染色体编号及其物理位置对家族成员予以命名，用于后续分析。其中，数字1和3分别代表1号和3号染色体，小写字母（a、b、d、e、f）代表同源染色体群的不同染色体。

1.2.2　甘薯*IbBADH*基因共线性分析　基于甘薯‘XS18’基因组数据，运用TBtools的One Step MCScanX Fact及Advanced Circos工具对物种内的共线性关系展开分析并予以可视化呈现；利用Simple *Ka*/*Ks* Calculator工具，计算非同义替换率（*Ka*）及同义替换率（*Ks*）。种间共线性分析选取拟南芥（*A.thaliana*）以及旋花科近缘种，包括小薯（*Ipomoea cordatotriloba*，其‘T2T’基因组序列及注释文件源自中国科学院北京基因组研究所国家基因组数据中心，BioProject注册号为PRJCA027907）、三叶裂薯（*Ipomoea triloba*，基因组数据从甘薯基因组资源数据库，https://sweetpotato.uga.edu/下载）、三浅裂野牵牛（*Ipomoea trifida*，基因组数据同样来源于甘薯基因组资源数据库，https://sweetpotato.uga.edu/）。借助TBtools软件中的One Step MCScanX Fact和Multiple Synteny Plot工具，对物种间的共线性关系展开分析，并以可视化形式展示。

1.2.3　甘薯IbBADH蛋白理化性质与亚细胞定位预测　利用Expasy protParam（https://web.expasy.org/protparam/）预测IbBADH蛋白的氨基酸长度、分子量、理论等电点、不稳定指数、脂肪系数及亲水性参数。利用CELL-Ploc（http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/）预测IbBADH蛋白的亚细胞定位。

1.2.4 BADH蛋白系统发育分析 为解析*BADH*家族的序列系统进化关系，收集拟南芥、水稻、甘薯及旋花科近缘种小薯、三叶裂薯和三浅裂野牵牛的BADH蛋白序列。在MEGA 12软件中采用ClustalW算法对BADH蛋白序列进行多序列比对。基于泊松校正模型，采用邻接法（Neighbor-Joining, NJ）构建系统发育树，并进行1 000次Bootstrap重复检验以评估分支可靠性。利用iTOL（http://www.itol.embl.de/）对系统进化树进行可视化与美化。

1.2.5 甘薯IbBADH蛋白保守基序与基因结构分析 将鉴定获得的甘薯IbBADH蛋白序列提交至MEME Suite（https://meme-suite.org/meme/）进行保守基序预测，最大保守基序数设置为20，其余参数采用默认设置。基于gff3注释文件提取*IbBADH*基因的外显子–内含子结构信息，并利用TBtools对其基因结构进行可视化分析。同时，结合CDD注释结果，对IbBADH蛋白的BADH/ALDH保守结构域进行标注。

1.2.6 启动子顺式作用元件分析 从‘XS18’基因组数据中提取*IbBADH*家族成员转录起始位点（transcription start site, TSS）上游2 000 bp的启动子序列。利用PlantCARE数据库（https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/）预测启动子顺式作用元件类型及分布，并使用TBtools进行统计与可视化分析。

1.2.7 甘薯*IbBADH*基因表达模式分析 为探究*IbBADH*家族成员在不同组织以及逆境、激素处理条件下的表达特性，自NCBI Sequence Read Archive（SRA）数据库下载甘薯转录组原始数据，数据编号范围为SRR8386014–SRR8386065，共计52个。样品包含纤维根（FR）、初始贮藏根（ISR）、根茎（RS）、块根远端（DE）、块根近端（PE）、茎（stem）和叶（leaf）不同组织，以及干旱（drought）、盐（salt）、低温（cold）、脱落酸（ABA）、茉莉酸甲酯（MeJA）、水杨酸（SA）不同处理的生物学重复样本。依据6个*IbBADH*基因在不同样品中的FPKM值，运用TBtools软件的HeatMap工具绘制基因表达热图。

1.2.8 甘薯*IbBADH1a*启动子克隆及顺式作用元件分析 设计启动子克隆引物Pro-*IbBADH1a*-F和Pro-*IbBADH1a*-R，以‘XS18’基因组DNA为模板扩增*IbBADH1a*启动子序列。PCR扩增采用2×Mix体系（北京康润诚业生物科技有限公司），反应条件按照试剂说明书进行（PCR反应采用50 μL体系，具体参数及扩增程序见附表1）。扩增产物经纯化后连接至pMD19-T载体，转化大肠杆菌DH5α感受态细胞，阳性克隆经测序验证正确后进一步用于顺式作用元件分析。

1.2.9 诱饵载体构建、转化及自激活检测 为筛选与*IbBADH1a*互作的潜在逆境响应调控因子，选取*IbBADH1a*启动子区含有防御和胁迫响应、低温响应及光信号响应相关顺式作用元件的区域（-1 609–-1 415 bp，共194 bp）作为酵母单杂交筛库的诱饵片段，命名为Pro-*IbBADH1a*-A。设计带有*Kpn* I和*Sal* I酶切位点的特异性引物（Pro-*IbBADH1a*-*Kpn*I-F/Pro-*IbBADH1a*-*Sal*-R，序列见附表2），扩增该片段，将扩增产物克隆至pAbAi载体中，构建诱饵重组质粒pAbAi-Pro-*IbBADH1a*-A，并经限制性内切酶酶切及测序验证。

将重组诱饵质粒pAbAi-Pro-*IbBADH1a*-A用限制性内切酶*Bst*B I线性化，用于后续转化Y1HGold菌株并进行自激活检测。采用酵母小量转化法（具体步骤见附件1）将线性化的诱饵质粒转化至Y1HGold菌株。通过在含不同浓度AbA（0、100、150、300 ng/mL）的SD/-Ura选择培养基上培养诱饵菌株，比较生长状况，从而确定用于后续文库筛选的最适AbA浓度。

1.2.10 甘薯块根cDNA酵母文库的筛选 以携带诱饵载体pAbAi-Pro-*IbBADH1a*-A的Y1HGold菌株为诱饵，对由甘薯品种‘XS18’‘徐紫薯3号’和‘日本红东’块根为材料构建的cDNA酵母次级文库进行筛选。诱饵菌株经扩增培养至对数生长期后，采用酵母大规模转化法（具体转化体系、操作步骤及培养基配方见附件2）将块根cDNA文库质粒转化至诱饵酵母感受态细胞中。转化产物涂布于含最适AbA浓度（100 ng/mL）的SD/-Leu选择培养基上进行初筛，获得的阳性克隆经复筛（再次划线于相同选择培养基）以降低假阳性。

1.2.11 阳性克隆鉴定与测序分析 对复筛后最终确认的108个阳性克隆采用通用引物T7-F和3′AD-R进行PCR鉴定（体系及程序见附表3）。PCR产物经测序后，利用NCBI BLAST和DNAMAN软件工具进行

序列比对与功能注释。相似度≥98%视为重复序列，仅保留一条代表性序列。剔除测序峰图质量不佳（主峰模糊、杂峰干扰严重）及序列长度<200 bp的低可信度序列。

1.2.12　阳性克隆的点对点Y1H验证　对注释为转录因子或潜在调控蛋白的候选克隆，提取其AD质粒并转化至诱饵酵母菌株中，进行点对点酵母单杂交验证。通过在含100 ng/mL或不含AbA的SD/-Leu选择培养基上比较转化子的生长情况，以验证候选蛋白与*IbBADH1a*启动子A段之间的特异性结合能力。

2　结果

2.1　甘薯*IbBADH*基因家族成员鉴定及染色体定位

使用BLASTP（E-value≤1×10^{-5}，BLOSUM62矩阵）对甘薯‘XS18’蛋白数据库进行同源检索，以拟南芥BADH蛋白序列作为查询序列，初步获得94条候选序列。随后通过CDD对候选蛋白进行保守结构域验证，剔除结构域（PLN02467）缺失或不完整的序列后，最终鉴定出6个具有完整保守结构域的*IbBADH*家族成员。这一结果表明，相对于拟南芥（2个）和水稻（3个），甘薯*IbBADH*家族成员数量有所扩张。

进一步用TBtools对*IbBADH*基因进行染色体定位可视化。结果显示（附图1），6个*IbBADH*基因分布于2个同源染色体群：其中4个成员位于1号染色体的a、d、e和f同源染色体（Chr01a、Chr01d、Chr01e、Chr01f），另外2个成员位于3号染色体的b和d同源染色体（Chr03b、Chr03d）。基于所在染色体的顺序和同源染色体的物理位置及其在Plant GARDEN数据库中的编号，将家族成员依次命名为*IbBADH1a*（Iba_chr01aCG19440）、*IbBADH1d*（Iba_chr01dCG16220）、*IbBADH1e*（Iba_chr01eCG6750）、*IbBADH1f*（Iba_chr01fCG5640）、*IbBADH3b*（Iba_chr03bCG9110）和*IbBADH3d*（Iba_chr03dCG9040）。

2.2　甘薯*IbBADH*基因家族共线性分析

为深入阐释*IbBADH*家族在甘薯多倍体化进程中的进化特性，开展了甘薯基因组内部*IbBADH*基因的共线性分析，以及其与拟南芥、旋花科近缘种的种间共线性分析。甘薯基因组内的共线性分析表明，在6个*IbBADH*成员中，有5个基因参与了物种内复制事件，共形成10个同源基因对（附图2）。发生片段重复的*IbBADH*基因的复制次数介于1–4次之间。在所有*IbBADH*基因中未检测到串联重复现象，表明片段重复是*IbBADH*基因家族进化与扩增的主要推动因素。此外，为评估*IbBADH*基因家族在进化进程中所受的选择压力类型，对10对共线性基因的*Ka*与*Ks*进行了分析，结果显示所有共线性基因对的*Ka*/*Ks*值均小于1，这表明*IbBADH*基因家族成员在片段复制事件后主要受到强烈的纯化选择压力，在进化过程中维持了高度保守的功能特征。

为探究*IbBADH*基因家族在进化过程中的保守性，分别将甘薯与拟南芥及旋花科近缘种（小薯、三裂叶薯、三浅裂野牵牛）进行了物种间共线性分析。与拟南芥的共线性分析显示，甘薯*IbBADH*基因与拟南芥*AtBADH*基因之间检测到11对直向同源基因对。与旋花科近缘种的共线性分析结果显示，甘薯与小薯、三裂叶薯、三浅裂野牵牛之间分别检测到6、9、11对直向同源基因对（附图3）。

上述结果表明，甘薯*IbBADH*基因与拟南芥及旋花科近缘种之间均存在广泛的共线性关系，尤其是与旋花科近缘种之间的共线性高度保守，提示*BADH*基因家族在旋花科进化过程中功能高度保守。

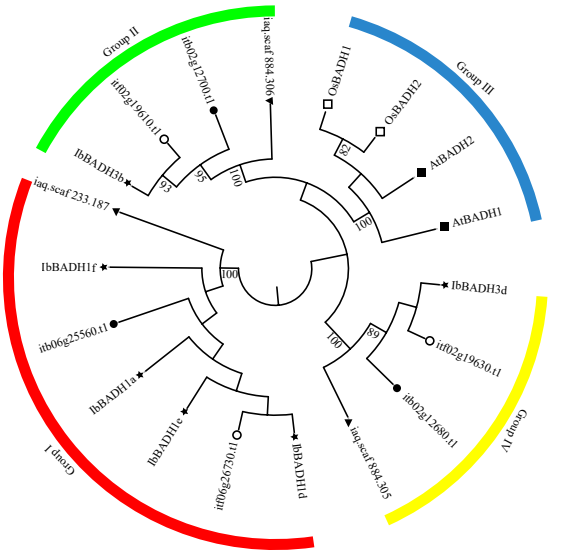
2.3　甘薯*IbBADH*基因家族理化性质分析

对6个IbBADH蛋白的理化性质分析结果显示，*IbBADH1a*、*IbBADH1d*、*IbBADH1e*和*IbBADH1f*的CDS长度均为1 512 bp，对应503 aa；*IbBADH3b*和*IbBADH3d*的CDS长度均为1 425 bp，对应474 aa。6个IbBADH蛋白相对分子量为51.47–55.13 kD，表明该家族蛋白整体规模相对保守。所有IbBADH蛋白的理论等电点（pI）为5.09至5.63（均<7.0），表明IbBADH蛋白总体呈酸性。各成员的不稳定指数均<40，预测均为稳定蛋白。平均亲水性（GRAVY）均为负值（-0.115–-0.008）提示蛋白整体偏亲水性；同时脂肪系数较高（88.57–97.41），提示其可能具有较好的热稳定性。亚细胞定位预测显示6个IbBADH蛋白均定位于叶绿体（chloroplast），提示*IbBADH*可能与叶绿体相关代谢和逆境响应过程有关，但仍需通过后续亚细胞定位实验进一步验证。

2.4　不同物种BADH蛋白系统发育分析

为解析BADH蛋白的进化关系，对来自甘薯及其近缘种（小薯、三浅裂野牵牛、三裂叶薯）以及

拟南芥和水稻6个物种的共19个BADH蛋白序列构建系统发育进化树（图1）。进化树将19个BADH蛋白分为4个亚类群，各类群分别包含7、4、4和4个成员。6个甘薯IbBADH蛋白主要分布于类群I、II和IV，小薯、三浅裂野牵牛和三裂叶薯在类群I、II和IV中也有分布，而拟南芥和水稻的BADH蛋白则主要聚类于类群III。综上，甘薯IbBADH与旋花科近缘种BADH亲缘关系更为接近，与拟南芥和水稻则相对较远。



★甘薯(*Ipomoea batatas*)；▲小薯(*Ipomoea cordatotriloba*)；●三浅裂野牵牛(*Ipomoea trifida*)；○三裂叶薯(*Ipomoea triloba*)；■水稻(*Oryza sativa*)；□拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)。系统树采用Neighbor-Joining方法构建，Bootstrap重复1 000次；不同符号表示不同物种

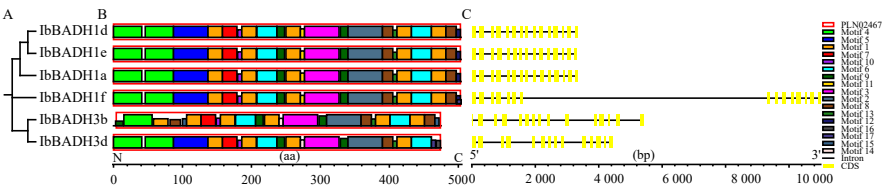
★ *Ipomoea batatas*; ▲ *Ipomoea cordatotriloba*; ● *Ipomoea trifida*; ○ *Ipomoea triloba*; ■ *Oryza sativa*; □ *Arabidopsis thaliana*. The phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-Joining method with 1 000 bootstrap replicates, and symbols indicate different species

图1 不同物种BADH蛋白的系统发育分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of BADH proteins from different species

2.5 甘薯IbBADH蛋白结构和保守基序分析

通过MEME在线工具对IbBADH蛋白的保守基序进行预测，并结合gff3注释信息分析基因结构。基因结构显示，*IbBADH1a*、*IbBADH1d*、*IbBADH1e*和*IbBADH1f*均包含15个外显子，而*IbBADH3b*与*IbBADH3d*均包含14个外显子。不同成员在内含子长度上存在显著差异。保守结构域分析表明，6个IbBADH蛋白均含有BADH相关保守结构域(PLN02467)，说明其功能核心区域高度保守。MEME共鉴定到17个保守基序（Motif 1–Motif 17）。其中Motif 1–Motif 10、Motif 12和Motif 13在所有成员中均存在，提示这些基序可能构成*BADH*家族的核心功能模块；部分基序呈成员特异性分布，例如Motif 14仅存在于IbBADH3b和IbBADH3d；Motif16和Motif 17只在IbBADH1f与IbBADH3d中出现；IbBADH3b含有两个Motif 15。总体来看，*IbBADH*家族在维持核心结构保守的同时，部分基序差异可能与成员功能分化相关（图2）。



A：IbBADH蛋白系统发育树；B：保守基序分布（不同颜色框代表不同Motif；红色外框表示BADH/ALDH保守结构域PLN02467）；C：外显子–内含子结构（黄色框表示外显子，黑线表示内含子）

A: Phylogenetic tree of IbBADH proteins; B: distribution of conserved motifs (colored boxes indicate motifs; the red frame indicates the conserved BADH/ALDH domain PLN02467); C: exon-intron structures (yellow boxes, exons; black lines, introns)

图2 *IbBADH*家族成员系统发育、保守基序与基因结构分析

Fig. 2 Phylogeny, conserved motifs, and gene structures of *IbBADH* family members

2.6 甘薯*IbBADH*基因家族的顺式作用元件分析

基于PlantCARE对*IbBADH*家族各成员启动子区域进行顺式作用元件预测。结果显示（图3），*IbBADH*启动子中顺式元件主要包括：逆境胁迫响应、激素响应、植物生长发育和光响应相关元件。逆境胁迫响应元件中，低温相关（如MYC）与非生物胁迫（如

STRE）所占比例较高。同时还检测到防御响应（TC-rich repeats）、干旱响应（MBS）以及低温响应（LTR）等元件。激素响应元件包括脱落酸响应（ABRE）、茉莉酸甲酯响应（CGTCA-motif）、水杨酸响应（as-1，TCA-element）、赤霉素响应（GARE-motif、P-box）以及生长素响应（TGA-element）等，其中ABRE数量较多。光响应元件（如G-box、Box 4）分布最为丰富。上述结果提示*IbBADH*家族成员可能参与甘薯生长发育及对环境、激素信号的响应过程。不同成员间的元件分布也有差异，暗示了其潜在的功能分化。

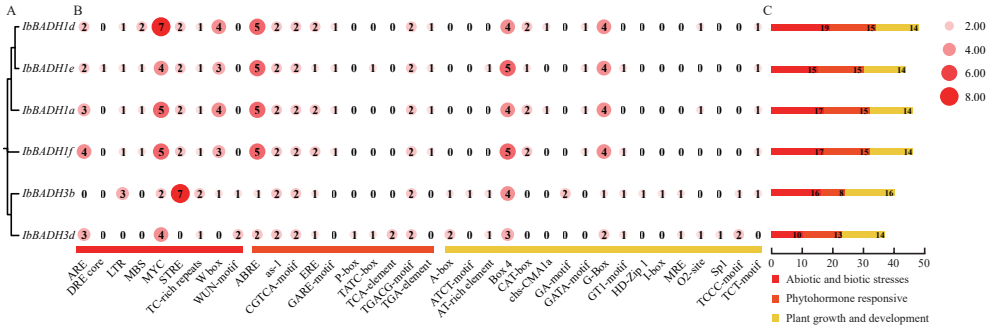
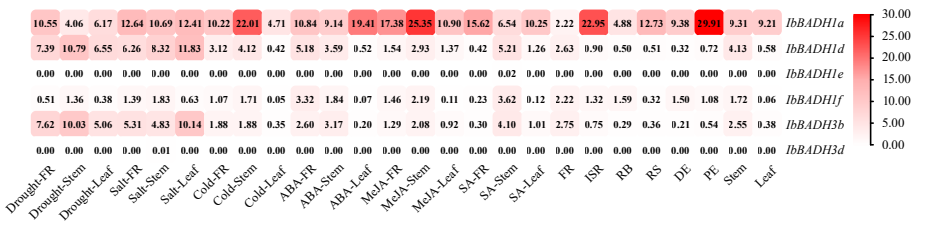


图3　*IbBADH*基因家族启动子区顺式调控元件的分布

Fig. 3　Distribution of *cis*-acting elements in the promoter regions of the *IbBADH* gene family

2.7　*IbBADH*基因表达模式分析

本研究基于转录组FPKM值分析，研究了*IbBADH*基因家族在甘薯不同组织及多种胁迫和激素处理条件下的表达模式。结果显示（图4），在所有样本中，*IbBADH1a*的表达水平均显著高于其他家族成员，尤其在块根近端、茉莉酸甲酯处理的茎和初始贮藏根中表达量最高，而其他家族成员在多数组织中的表达水平均较低（FPKM多低于3），对各种胁迫和激素的响应也较弱。从组织特异性来看，地下组织（FR、ISR、RB、RS、DE、PE）与地上组织（叶、茎）的*BADH*基因表达存在明显差异。块根近端（PE），*IbBADH1a*的表达量最高，在初始贮藏根（ISR）中次之。在非生物胁迫响应方面，干旱、盐和冷胁迫处理均影响*IbBADH*基因的表达。其中，*IbBADH1a*在冷胁迫的茎中表达量最高，在干旱处理和盐处理的纤维根中表达量较高。在激素信号响应方面，*IbBADH1a*在茉莉酸甲酯（MeJA）处理的茎中的表达量最高，其次是脱落酸（ABA）处理的叶和水杨酸（SA）处理的纤维根，暗示*IbBADH1a*可能参与多种激素介导的信号通路，协同调控甘薯的生长发育。以上分析表明*IbBADH1a*能响应所检测的胁迫和激素处理，是该家族的核心多功能调控基因。



ABA：脱落酸；MeJA：茉莉酸甲酯；SA：水杨酸；FR：纤维根；ISR：初始贮藏根；RB：根体；RS：根茎；DE：块根远端；PE：块根近端

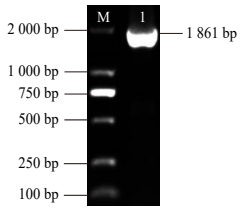
ABA: Abscisic acid; MeJA: methyl jasmonate; SA: salicylic acid; FR: fibrous roots; ISR: initiative storage roots; RB: root bodies; RS: root stalks; DE: distal ends of the tuber; PE: proximal ends of the tuber

图4　*IbBADH*基因家族在甘薯不同组织及胁迫/激素处理下的表达热图

Fig. 4　Heatmap of *IbBADH* expression profiles in different sweetpotato tissues following treatment with various abiotic stresses and hormones

2.8 甘薯*IbBADH1a*启动子克隆及顺式元件分析

以‘XS18’基因组DNA为模板，成功克隆获得长度为1 861 bp的*IbBADH1a*启动子序列（图5）。利用PlantCARE对*IbBADH1a*启动子顺式元件进行预测。除基本核心元件TATA-box、CAAT-box与ATTATA-box外，*IbBADH1a*启动子还含有光响应（TCT-motif和chs-CMA1a）、激素响应（ERE、TGA-element、CGTCA-motif、GARE-motif、ABRE），分生组织表达（CAT-box）、代谢调控（O_2-site）、发育调控（W-box）以及非生物胁迫相关（MYB/MYB-like、MYC、ARE）等元件，提示*IbBADH1a*可能受多种环境与激素信号共同调控。



M：DL2 000 marker，1：*IbBADH1a*扩增产物

M: DL2 000 marker, 1: PCR product of *IbBADH1a*

图5 *IbBADH1a*启动子的PCR产物电泳图

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of PCR products of the *IbBADH1a* promoter

2.9 *IbBADH1a*诱饵片段选取及诱饵载体构建

基于*IbBADH1a*启动子顺式作用元件预测结果，根据元件类型及其分布位置，选取一段含有防御和胁迫响应、低温响应及光信号响应元件的区域（-1 609–1 415 bp，共194 bp）作为酵母单杂交筛库的诱饵片段，命名为Pro-*IbBADH1a*-A（附图4）。以甘薯基因组DNA为模板，用带*Kpn* I与*Sal* I酶切位点的特异性引物PCR扩增，获得194 bp的特异条带，测序结果与参考序列一致性为100%。将Pro-*IbBADH1a*-A与pAbAi载体分别进行*Kpn* I/*Sal* I双酶切、连接，成功构建诱饵重组载体pAbAi-Pro-*IbBADH1a*-A，并经双酶切验证正确。

2.10 酵母单杂筛库

使用*Bst*B I酶线性化pAbAi-Pro-*IbBADH1a*-A重组诱饵质粒并转化Y1HGold酵母菌株。以pAbAi-F/R为引物的PCR鉴定，表明诱饵质粒已成功整合至酵母基因组。为确定抑制诱饵菌株生长的最低AbA浓度，将阳性诱饵菌液稀释后涂布于含不同AbA浓度（0、100、150、300 ng/mL）的SD/-Ura平板上。结果显示，诱饵菌株在无AbA平板上正常生长，而100 ng/mL及以上AbA浓度下生长被完全抑制，因此确定100 ng/mL AbA为后续筛选的有效抑制浓度（图6）。

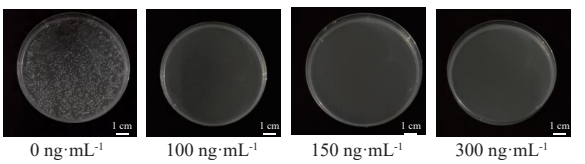


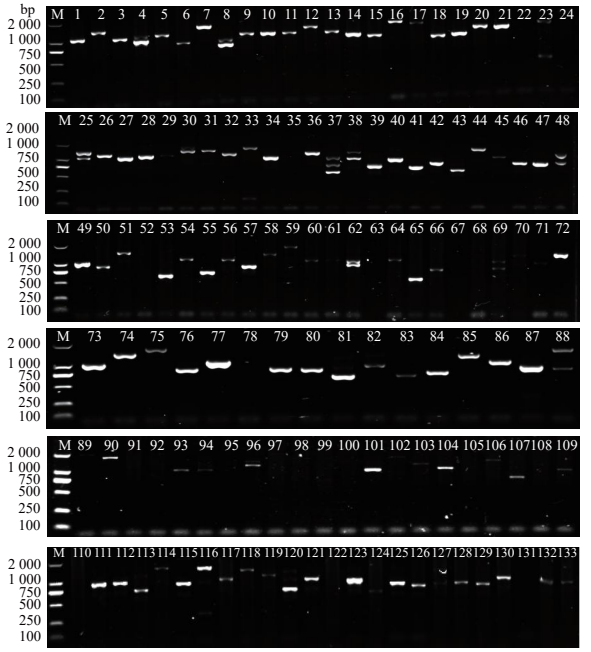
图6 不同AbA浓度下诱饵菌株的自激活抑制检测

Fig. 6 Suppression of bait autoactivation at different AbA concentrations

以Y1HGold[pAbAi-Pro-*IbBADH1a*-A]为诱饵菌株，对甘薯块根cDNA酵母文库进行筛选。在SD/-Leu/AbA选择培养基上经初筛获得133个候选克隆，通过复筛去除假阳性后，最终获得108个阳性克隆。对上述阳性克隆进行插入片段PCR鉴定，扩增片段长度主要分布于500–2 000 bp，符合文库构建预期（图7）。对108个阳性克隆的PCR产物进行测序，经去除冗余（相似度≥98%）及低质量序列后，共获得44条非冗余的高质量序列作为潜在候选结合蛋白。

2.11 部分阳性克隆的Y1H验证

将44条序列在NCBI数据库中进行BLASTX比对，根据功能注释进行分类。选取逆境响应调控因子基础转录因子3（basal transcription factor 3, BTF3）、茎部特异蛋白TSJT1（stem-specific protein, TSJT1）、碱性螺旋–环–螺旋转录因子49（basic helix-loop-helix 49, bHLH49）和乙烯响应转录因子073（ethylene-responsive factor 073, ERF073）进行克隆，提取酵母质粒并转化至DH5α感受态细胞，经PCR鉴定后提取阳性菌质粒进行测序。将酵母破壁PCR测序结果与质粒测序结果一致的单克隆进一步用于Y1H点对点验证。结果显示，在不含AbA的SD/-Leu培养基上，各转化子均可正常生长；而在含AbA的SD/-Leu培养基上，携带AD空载体的对照菌株生长受到抑制，而含上述4个候选基因的转化子均可正常生长，且在高倍稀释条件下仍可形成菌落（图8）。上述结

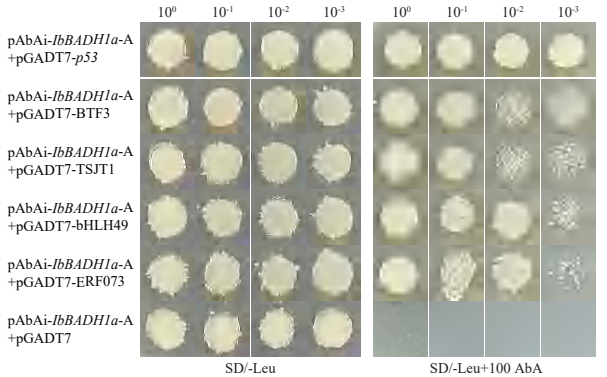


M：DL2 000 marker；1–133：不同阳性克隆的PCR扩增产物

M: DL2 000 marker; 1–133: PCR products amplified from different positive clones

图7　筛库阳性克隆插入片段PCR鉴定

Fig. 7　PCR identification of inserts from positive Y1H library clones



AD为空载体阴性对照；BTF3、TSJT1、bHLH49和ERF073为候选调控因子；在SD/-Leu与SD/-Leu/AbA（100 ng/mL）平板上点滴培养并观察生长

AD empty vector served as a negative control; BTF3, TSJT1, bHLH49, and ERF073 were candidate regulatory factors. Transformants were spotted on SD/-Leu and SD/-Leu/AbA (100 ng/mL) plates for growth assessment

图8　*IbBADH1a*启动子A段候选调控因子的点对点Y1H验证

Fig. 8　Point-to-point Y1H verification of candidate regulatory factors of *IbBADH1a* promoter A segment

果表明，BTF3、TSJT1、bHLH49、ERF073与*IbBADH1a*启动子A段发生特异性结合。

3　讨论

本研究在六倍体甘薯基因组中共鉴定到6个*IbBADH*家族成员。已有报道显示，不同物种*BADH*家族成员数量存在明显差异，如烟草4个[28]、玉米3个[29]、水稻2个[30]。不同物种含有不同数量的家族成员，这通常与基因组倍性演化过程中的基因复制、拷贝保留与丢失事件密切相关。为验证这一推测，本研究开展的种内共线性分析共检测到10对片段重复基因，且所有复制基因对的*Ka*/*Ks*值均小于1，表明这些基因在扩张后经历了强烈的纯化选择，功能趋于保守。未发现串联重复事件，提示片段重复是*IbBADH*家族扩增的主要驱动力。种间共线性分析显示，甘薯*IbBADH*基因与旋花科近缘种存在广泛的共线性关系，证实该家族在旋花科中进化保守。

IbBADH蛋白含有高度一致的外显子–内含子结构、保守基序及关键催化残基，表明其在功能核心区域受到强烈的进化保守选择。亚细胞定位预测提示*IbBADH*成员主要定位于叶绿体，这与*BADH*的生物学功能高度契合。在光合细胞中，甜菜碱的积累对于保护光合机构免受渗透胁迫至关重要。这种结构—定位—功能的一致性表明该家族在甘薯逆境响应中可能发挥重要功能。亚细胞定位仍需通过荧光标记等体内实验进一步验证。

启动子顺式作用元件是决定基因表达时空特异性及环境响应能力的重要调控模块。*IbBADH*启动子区域富含脱落酸、茉莉酸和水杨酸等激素响应元件以及MYB、MYC、LTR等逆境相关元件，其中ABRE元件数量占比较高，提示*IbBADH*可能受ABA信号通路调控。已有研究表明，ABA可诱导*BADH*表达并促进甜菜碱合成，从而增强植物对逆境胁迫的耐受性[31]。值得注意的是，不同*IbBADH*成员间的元件分布存在差异，例如，*IbBADH1a*富含ABRE，而*IbBADH3b*则富集LTR元件。这种差异表明不同*IbBADH*成员可能响应不同的胁迫信号，在甘薯应对复杂环境时发挥协同功能。基于这一调控逻辑，本研究选取含有多种胁迫响应元件的*IbBADH1a*启动子片段进行Y1H筛选。

*IbBADH1a*的表达水平均显著高于其他家族成员，尤其在块根近端中表达量最高。块根是甘薯的贮藏器官，也是逆境胁迫直接作用的部位。高水平

的*IbBADH1a*表达可能有助于在块根发育过程中提前积累甜菜碱，为其应对土壤逆境（如干旱、盐渍）提供“渗透保护储备”。同时，*IbBADH1a*在多种胁迫和激素处理下均显著上调，表明*IbBADH1a*是一个广谱型逆境响应基因，能够响应多种非生物胁迫，这与*BADH*基因表达后合成甜菜碱，进而保护细胞膜和蛋白质功能的经典机制完全吻合[32]，也与其启动子富含ABRE、LTR等响应元件高度一致。

通过以*IbBADH1a*启动子A段为诱饵的酵母单杂交筛选，共获得了44个潜在上游调控因子，进一步的点对点Y1H验证表明，*IbBADH1a*-A可与BTF3、TSJT1、bHLH49和ERF073特异性结合。BTF3的表达受NaCl、ABA等多种胁迫信号的调控[33]，与*IbBADH1a*启动子中ABA响应元件的富集相呼应，提示BTF3可能介导ABA信号对*IbBADH1a*的调控。TSJT1是ABA诱导型抗旱相关蛋白[34-35]，与启动子中的ABRE元件形成潜在调控通路，为*IbBADH1a*可能参与抗旱响应提供了转录层面的解释。bHLH49在甘薯源–库协同及淀粉积累中发挥关键作用[36]，也参与小麦抗旱调控[37]，提示*IbBADH1a*可能不仅响应逆境，还与品质形成存在交叉。ERF073参与淹水/耐涝调控[38-39]，与启动子中存在ERE类元件呼应。

综合上述分析，本研究提出如下调控模型：在ABA、低温或干旱等逆境条件下，BTF3、TSJT1、bHLH49、ERF073等逆境调控因子可能通过与*IbBADH1a*启动子中的相应顺式元件结合，协同或独立地激活其表达，促进甜菜碱合成，进而调节甘薯对不同类型逆境的适应性（附图5）。

然而，本研究存在一定局限性。候选因子与启动子的互作仅通过酵母单杂交验证，其体内结合活性及调控效应仍需通过双荧光素酶报告系统、染色质免疫共沉淀（ChIP）等实验进一步证实。此外，本研究尚未开展遗传转化功能验证，因此其在抗逆中的具体功能仍需深入探究。后续研究拟构建上述调控因子的过表达及CRISPR/Cas9基因编辑载体，通过甘薯遗传转化来验证其在甘薯抗逆性中的功能。

4 结论

从六倍体甘薯‘XS18’基因组中鉴定出6个*IbBADH*家族成员，分别位于第1和第3同源染色体群。*IbBADH1a*在块根近端及多种胁迫下高表达，其启动子可被BTF3、TSJT1、bHLH49和ERF073特异性结合，从而揭示其逆境转录调控模型。

文章所有附图附表请点击链接查看（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260612163651_NewsFile_4.pdf）

参考文献

[1] Pan SM, Moreau RA, Yu C, et al. Betaine accumulation and betaine-aldehyde dehydrogenase in spinach leaves [J]. Plant Physiol, 1981, 67(6): 1105-1108.

[2] Wang YZ, Lu JJ, Shi XZ, et al. Identification, characterization, and expression profiling of *Oryza sativa* betaine aldehyde dehydrogenase genes exposed to realistic environmental contamination of oxyfluorfen [J]. Trop Plant Biol, 2025, 18: 47.

[3] Weretilnyk EA, Hanson AD. Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, 87(7): 2745-2749.

[4] 陈翠萍. 藜麦*BADH*基因家族鉴定及生物信息学分析 [J]. 分子植物育种, 2023, 21(19): 6276-6284.
Chen CP. Identification and bioinformatics analysis of *BADH* gene family in quinoa [J]. Mol Plant Breed, 2023, 21(19): 6276-6284.

[5] Golestan Hashemi FS, Ismail MR, Rafii MY, et al. Critical multifunctional role of the *betaine aldehyde dehydrogenase* gene in plants [J]. Biotechnol Biotechnol Equip, 2018, 32(4): 815-829.

[6] Zhang YY, Dai TY, Liu YH, et al. Effect of exogenous glycine betaine on the germination of tomato seeds under cold stress [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(18): 10474.

[7] Fitzgerald TL, Waters DLE, Henry RJ. Betaine aldehyde dehydrogenase in plants [J]. Plant Biol, 2009, 11(2): 119-130.

[8] Su JS, Zhang F, Chong XR, et al. Genome-wide association study identifies favorable SNP alleles and candidate genes for waterlogging tolerance in chrysanthemums [J]. Hortic Res, 2019, 6: 21.

[9] El-Atroush H, Mostafa E, Osman S. Molecular characterization of betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) gene and proline estimation in *Hordeum vulgare* L. in response to abiotic stress [J]. Egypt Acad J Biol Sci C Physiol Mol Biol, 2020, 12(2): 1-21.

[10] Liu XS, Zeng X, Zhu YH, et al. Degradation of betaine aldehyde dehydrogenase transgenic maize BZ-136 straw and its effects on soil nutrients and fungal community [J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1180310.

[11] Ali S, Abbas Z, Seleiman MF, et al. Glycine betaine accumulation, significance and interests for heavy metal tolerance in plants [J]. Plants, 2020, 9(7): 896.

[12] Aghdam MS, Asle-Mohammadi Z, Ebrahimi A, et al. Exogenous

dopamine application ameliorates chilling injury and preserves quality of kiwifruit during cold storage [J]. Sci Rep, 2025, 15: 2894.

[13] Jin HX, Tang M, Zhu LM, et al. Characterization of a drought-induced betaine aldehyde dehydrogenase gene *SgBADH* from *Suaeda glauca* [J]. Plants, 2024, 13(19): 2716.

[14] Wang GP, Li F, Zhang J, et al. Overaccumulation of glycine betaine enhances tolerance of the photosynthetic apparatus to drought and heat stress in wheat [J]. Photosynthetica, 2010, 48(1): 30-41.

[15] Hasthanasombut S, Ntui V, Supaibulwatana K, et al. Expression of Indica rice *OsBADH1* gene under salinity stress in transgenic tobacco [J]. Plant Biotechnol Rep, 2010, 4(1): 75-83.

[16] Zhang N, Si HJ, Wen G, et al. Enhanced drought and salinity tolerance in transgenic potato plants with a *BADH* gene from spinach [J]. Plant Biotechnol Rep, 2011, 5(1): 71-77.

[17] Qin D, Zhao CL, Liu XY, et al. Transgenic soybeans expressing betaine aldehyde dehydrogenase from *Atriplex canescens* show increased drought tolerance [J]. Plant Breed, 2017, 136(5): 699-709.

[18] Niazian M, Ahmad Sadat-Noori S, Tohidfar M, et al. Betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH*) *vs*. flavodoxin (fld): two important genes for enhancing plants stress tolerance and productivity [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 650215.

[19] Niazian M, Ahmad Sadat-Noori S, Tohidfar M, et al. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of ajowan (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague): an important industrial medicinal plant [J]. Ind Crops Prod, 2019, 132: 29-40.

[20] Zhou MQ, Thompson WA, Tang W. The *Arabidopsis* AtAAE13.1 gene enhances salt stress tolerance in angiosperms and gymnosperm plant cells [J]. In Vitro CellDevBiol-Plant, 2020, 56(6): 750-764.

[21] Ali A, Ali Q, Iqbal MS, et al. Salt tolerance of potato genetically engineered with the *Atriplex canescens BADH* gene [J]. Biologia Plant, 2020, 64: 271-279.

[22] Li PF, Cai J, Luo X, et al. Transformation of wheat *Triticum aestivum* with the HvBADH1 transgene from hulless barley improves salinity-stress tolerance [J]. Acta Physiol Plant, 2019, 41(9): 155.

[23] Chen THH, Murata N. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications [J]. Plant Cell Environ, 2011, 34(1): 1-20.

[24] Kwak SS. Biotechnology of the sweetpotato: ensuring global food and nutrition security in the face of climate change [J]. Plant Cell Rep, 2019, 38(11): 1361-1363.

[25] Xiao Y, Zhu MK, Gao SP. Genetic and genomic research on sweet potato for sustainable food and nutritional security [J]. Genes, 2022, 13(10): 1833.

[26] Yan MX, Nie HZ, Wang YZ, et al. Exploring and exploiting genetics and genomics for sweetpotato improvement: Status and perspectives [J]. Plant Commun, 2022, 3(5): 100332.

[27] 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.

[28] Chen ML, Shen SY, Li ZY, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of betaine aldehyde dehydrogenase 2 (BADH2) in tobacco affects 2-acetyl-1-pyrroline [J]. Agronomy, 2024, 14(2): 321.

[29] Wang YX, Liu XQ, Zheng XX, et al. Creation of aromatic maize by CRISPR/Cas [J]. J Integr Plant Biol, 2021, 63(9): 1664-1670.

[30] Kotchoni SO, Jimenez-Lopez JC, Gao DY, et al. Modeling-dependent protein characterization of the rice aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily reveals distinct functional and structural features [J]. PLoS One, 2010, 5(7): e11516.

[31] Zhang LX, Gao M, Hu JJ, et al. Modulation role of abscisic acid (ABA) on growth, water relations and glycinebetaine metabolism in two maize (*Zea mays* L.) cultivars under drought stress [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(3): 3189-3202.

[32] Hou R, Yang L, Wuyun T, et al. Genes related to osmoregulation and antioxidation play important roles in the response of *Trollius chinensis* seedlings to saline-alkali stress [J]. Front Plant Sci, 2023, 14: 1080504.

[33] Wang WY, Xu MY, Wang Y, et al. Basal transcription factor 3 plays an important role in seed germination and seedling growth of rice [J]. BioMed Res Int, 2014, 2014: 465739.

[34] Wang YX, Zhang H, Gao SP, et al. The ABA-inducible gene *IbTSJT1* positively regulates drought tolerance in transgenic sweetpotato [J]. J Integr Agric, 2025, 24(4): 1390-1402.

[35] Yuan C, He LL, Chen DH, et al. TSJT1 and glutamate is required for aluminum tolerance associated with mitochondrial pyruvate carrier 1 in *Arabidopsis* [J]. Plant Signal Behav, 2025, 20: 2526765.

[36] Jiang ZC, Wei ZH, Zhang J, et al. Source-sink synergy is the key unlocking sweet potato starch yield potential [J]. Nat Commun, 2024, 15: 7260.

[37] Liu H, Yang Y, Liu DD, et al. Transcription factor TabHLH49 positively regulates dehydrin *WZY2* gene expression and enhances drought stress tolerance in wheat [J]. BMC Plant Biol, 2020, 20: 259.

[38] Xi DD, Gao L, Ge L, et al. Combined transcriptome and metabolome analysis provides insight into the ERF073-Malic acid network in pakchoi under submergence stress [J]. Plant Stress, 2025, 15: 100708.

[39] Bai DF, Zhong YP, Gu SC, et al. AvERF73 positively regulates waterlogging tolerance in kiwifruit by participating in hypoxia response and mevalonate pathway [J]. Hortic Plant J, 2025, 11(1): 162-174.

（责任编辑　张婷婷）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):124-133

黄瓜*CsWRKY12*基因的克隆及抗旱功能鉴定

李昌焱[1#] 夏康力[2, 3#] 王蒙[2] 杨凤[2] 郭学平[2] 胡朝阳[2] 周跃龙[2]
刘世强[2] 周勇[2*]

（1.湖北省农业科学院粮食作物研究所 农业农村部农作物分子育种重点实验室 粮食作物种质与遗传改良湖北省重点实验室,武汉 430064;
2.江西农业大学生物科学与工程学院,南昌 330045; 3.东华理工大学化学与材料学院,南昌 330013）

摘 要:【目的】WRKY转录因子在植物生长发育及抵御胁迫过程中具有重要调控作用。探究黄瓜*CsWRKY12*基因在干旱胁迫中的功能，为解析黄瓜响应干旱胁迫的分子调控机制提供基础。【方法】以黄瓜品种‘9930’为材料，克隆*CsWRKY12*基因的开放阅读框，并对其基因和蛋白序列进行分析。通过实时荧光定量PCR技术分析*CsWRKY12*在黄瓜不同组织及干旱胁迫不同时间的表达模式。构建过表达载体，分别转化黄瓜毛状根和拟南芥，探索*CsWRKY12*基因在干旱胁迫中的功能。【结果】*CsWRKY12*基因的开放阅读框为939 bp，编码312个氨基酸的蛋白质，其含有1个WRKY结构域和C2H2型锌指结构。基因结构显示该基因由4个外显子和3个内含子组成。系统进化分析表明，CsWRKY12和冬瓜中的同源蛋白亲缘关系最近。RT-qPCR结果显示，*CsWRKY12*在黄瓜的雄花和叶片中表达量较高，且干旱处理可显著诱导其表达上调。在黄瓜毛状根中过表达*CsWRKY12*发现，过表达毛状根的SOD和POD活性在干旱胁迫后明显高于对照，暗示过表达*CsWRKY12*可提高植物抗旱性。进一步通过农杆菌介导的方法获得过表达*CsWRKY12*的拟南芥转基因植株，发现转基因植株在干旱处理下，SOD和POD活性明显提升，脯氨酸含量和干旱响应基因的表达明显高于野生型，而相对电导率和MDA含量则明显低于野生型植株。【结论】*CsWRKY12*可通过增强活性氧清除能力、促进渗透调节物质积累、减轻膜脂过氧化损伤以及调控干旱响应基因的表达，在黄瓜抵御干旱胁迫过程中发挥正向调控作用。

关键词： 黄瓜；*WRKY*基因；*CsWRKY12*；干旱胁迫；转基因拟南芥；毛状根；功能鉴定；表达分析

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1260

Cloning and Functional Characterization of Cucumber *CsWRKY12* Gene in Drought Tolerance

LI Chang-yan[1#] XIA Kang-li[2, 3#] WANG Meng[2] YANG Feng[2] GUO Xue-ping[2] HU Zhao-yang[2]
ZHOU Yue-long[2] LIU Shi-qiang[2] ZHOU Yong[2*]

(1. *Hubei Key Laboratory of Food Crop Germplasm and Genetic Improvement, Key Laboratory of Crop Molecular Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Food Crops, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan* 430064; 2. *College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang* 330045; 3. *College of Chemistry and Materials, East China University of Technology, Nanchang* 330013)

Abstract:【Objective】WRKY transcription factors play important regulatory roles in plant growth, development, and stress responses. This study aims to investigate the function of the cucumber *CsWRKY12* gene in drought stress, providing a basis for elucidating the molecular regulatory mechanisms of cucumber response to drought stress.【Method】The open reading frame (ORF) of *CsWRKY12* was cloned using the cucumber variety ‘9930’ as the material, and its gene and protein sequences were subsequently analyzed. The expression patterns of *CsWRKY12* in different cucumber tissues and at different time under drought stress were determined using quantitative real-time PCR (RT-qPCR). Overexpression vectors were constructed and transformed into cucumber hairy roots and *Arabidopsis thaliana* to explore the function of *CsWRKY12* in response to drought stress.【Result】The *CsWRKY12* gene contains an ORF of 939 bp, encoding a 312-amino acid protein with one WRKY domain and a

收稿日期： 2025-11-20
基金项目： 国家自然科学基金项目（42467006），粮食作物种质创新与遗传改良湖北省重点实验室开放课题（2025lzjj02）
*通信作者： 周勇 yongzhou@jxau.edu.cn
#同等贡献

C2H2-type zinc finger domain. Gene structure analysis revealed that *CsWRKY12* consists of 4 exons and 3 introns. Phylogenetic analysis showed that CsWRKY12 displays the closest evolutionary relationship to its homologous protein in *Benincasa hispida*. RT-qPCR results demonstrated that *CsWRKY12* is highly expressed in male flowers and leaves, and its expression is significantly upregulated under drought stress. Overexpression of *CsWRKY12* in cucumber hairy roots resulted in significantly higher SOD and POD activities under drought stress compared to control, suggesting that *CsWRKY12* overexpression may enhance plant drought tolerance. Furthermore, transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing *CsWRKY12* were obtained via *Agrobacterium*-mediated transformation, and the transgenic plants exhibited significantly higher SOD and POD activities, proline content, and expression levels of drought-responsive genes under drought stress, while the relative electrical conductivity and MDA content were significantly lower than those in wild-type (WT) plants.【Conclusion】*CsWRKY12* plays a positive regulatory role in drought stress response by enhancing reactive oxygen species scavenging capacity, promoting the accumulation of osmotic adjustment substances, alleviating membrane lipid peroxidation damage, and regulating the expression of drought-responsive genes.

Keywords: cucumber; *WRKY* gene; *CsWRKY12*; drought stress; transgenic *Arabidopsis*; hairy root; functional characterization; expression analysis

黄瓜（*Cucumis sativus* L.）作为葫芦科一年生蔓生或攀缘草本植物，是全球十大蔬菜作物之一，也是我国各地广泛栽培的重要经济作物。其果实风味清香、口感脆爽，富含蛋白质、多种维生素等营养成分，兼具保健、延缓衰老等功效，深受消费者喜爱。然而，由于黄瓜本身抗逆能力有限，在其生长过程中易受多种逆境胁迫的影响，特别是干旱胁迫会破坏细胞结构，抑制光合作用，加剧蒸腾导致水分流失，影响产量与品质。因此，深入开展黄瓜抗逆育种研究，对培育高产优质品种、推动黄瓜种植业的可持续发展具有重要的现实意义。

WRKY转录因子是高等植物中最大的转录因子家族之一，其成员均包含约60个氨基酸组成的WRKY结构域，该结构域由保守的WRKYGQK核心序列及C端的锌指结构共同构成。WRKY的DNA结合域序列基于七肽WRKYGQK，但也存在一些变异形式（如WRKYGKK、WRKYGMK、WSKYGQK、WKRYGQK、WVKYGQK和WKKYGQK等），七肽序列的多样化修饰导致了DNA结合能力的差异化[1]。锌指结构主要包括C2H2和C2HC两种类型。其中，C2H2型锌指的核心序列为$CX_{4-5}CX_{22-23}HXH$，而C2HC型锌指的特征序列则为$CX_7CX_{23}HXC$[2]。根据结构域数量和锌指类型，WRKY蛋白可分为3类：I类通常含有2个WRKY结构域和1个C2H2锌指结构；II类和III类仅含1个WRKY结构域，其中II类的锌指结构为C2H2型，而III类为C2HC型[3]。

SPF1是首个被鉴定的WRKY转录因子，发现于甘薯（*Ipomoea batatas* L.）中，属于典型的I类成员[4]，随后在不同物种中陆续报道了越来越多的*WRKY*基因。同时，随着多种植物基因组测序的完成，*WRKY*基因的全基因组鉴定研究也已广泛开展，研究显示*WRKY*基因的数量在不同植物中存在显著差异[5]。WRKY转录因子通过识别并结合靶基因启动子中的W-box顺式作用元件（TTGACC/T）行使功能，其七肽序列与锌指结构共同保障了该结合过程的高效性。诸多研究表明WRKY转录因子广泛参与植物生长发育进程，包括种子休眠与萌发[6-7]、株高[8]、表皮毛发育[9]、开花[10]、叶片衰老[11]、果实成熟[12]，以及各种次生代谢物的合成[13-14]等。同时，大量研究表明WRKY成员在植物抵御生物胁迫中发挥重要作用[15]。例如，辣椒（*Capsicum annuum* L.）CaWRKY01-10和CaWRKY08-4可以通过直接激活相同的4个防御相关基因，从而赋予辣椒对疫霉菌侵染的抗性[16]。水稻（*Oryza sativa* L.）OsWRKY成员在多种病害（如稻瘟病、白叶枯病）和虫害（如褐飞虱、螟虫）的防御过程中均发挥重要功能[17-20]。此外，阐明*WRKY*基因在植物非生物胁迫响应中的调控作用是目前的研究重点之一，因其既可正向亦能负向调控植物的抗逆性。例如，不同植物的WRKY成员在干旱[21-22]、低温[23-24]、高温[25-26]、高盐[27-28]等非生物胁迫中均发挥正向调控功能。而PalWRKY77通过抑制ABA信号通路中的关键靶基因，负向调控杨树的耐盐性[29]。OsWRKY63作为转录抑制因子，通过OsWRKY63-OsWRKY76-OsDREB1B级联通路负向调控水稻耐冷性[30]。黄瓜中的研究结果也表明，CsWRKY50能

正向调控黄瓜对霜霉病的抗性[31]，CsWRKY46则在低温胁迫中发挥关键作用[32]。

前人对黄瓜*WRKY*基因家族成员进行鉴定发现，大部分黄瓜*WRKY*基因响应各种非生物和生物胁迫[33]，然而黄瓜*WRKY*基因的功能研究仍然较为欠缺。本研究从黄瓜品种华北型‘9930’中克隆得到*CsWRKY12*基因，通过序列分析、实时荧光定量PCR、基因过表达以及抗逆生理指标测定等方法，对该基因在干旱胁迫中的功能进行研究，为今后深入探究其参与非生物胁迫的分子机制及黄瓜抗逆分子育种提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用的拟南芥（*Arabidopsis thaliana* L.）为Col-0生态型，黄瓜所用品种为华北型‘9930’，均由本实验室保存。实验所用大肠杆菌感受态细胞DH5α、农杆菌感受态细胞GV3101和K599均购自上海唯地生物技术有限公司。取成熟期黄瓜植株的根、茎、叶、雄花、雌花及果实等不同组织样品，迅速置于-80 ℃超低温冰箱中保存，用于后续组织特异性表达分析。对14 d龄的黄瓜幼苗施加10%（w/v）PEG-6000模拟干旱条件，分别于胁迫处理后的0、3、6、12和24 h采集叶片样品，每个时间点设置3次生物学重复。

1.2 方法

1.2.1 *CsWRKY12*基因的克隆 用RNA-easy Isolation Reagent试剂盒（诺唯赞，南京）提取总RNA，随后利用HiScript II Q RT SuperMix for qPCR反转录试剂盒（诺唯赞，南京）反转录得到cDNA。*CsWRKY12*的编码序列（CDS）从CuGenDB数据库（http://cucurbitgenomics.org/organism/20）中获取，其基因编号为CsaV3_2G032460。设计*CsWRKY12*基因特异性引物（附表1），以黄瓜叶片cDNA为模板进行CDS全长扩增，PCR产物送生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。

1.2.2 生物信息学分析 在CuGenDB数据库下载*CsWRKY12*的基因组序列及编码的氨基酸序列。利用GSDS工具（http://gsds.gao-lab.org/）绘制*CsWRKY12*基因结构图。CsWRKY12蛋白的理化性质利用ProtParam工具（https://web.expasy.org/protparam/）进行分析，包括分子量、等电点和总平均亲水性。使用CELLO工具（https://cello.life.nctu.edu.tw/）预测CsWRKY12蛋白的亚细胞定位。利用Blast程序（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）查找其他物种中CsWRKY12的同源蛋白序列，采用MEGA软件进行序列比对，并用邻接法构建系统进化树。

1.2.3 植物表达载体的构建 以黄瓜叶片cDNA为模板，使用附表1中的基因特异性引物扩增*CsWRKY12*的CDS全长，采用同源重组的方法将其分别克隆至植物表达载体pCAMBIA3301-GFP和pHB中，构建融合表达载体*CsWRKY12*-GFP和pHB-*CsWRKY12*。经筛选和阳性克隆验证后，将重组质粒分别导入K599和GV3101农杆菌菌株，并通过PCR对单克隆进行验证。

1.2.4 黄瓜毛状根转化与干旱胁迫处理 将黄瓜幼苗从培养土中取出，平整切去植株地下部分后，将植株切口处重复涂抹带有重组*CsWRKY12*-GFP农杆菌K599菌液的培养基，将地上部分插入带有蛭石的盆中，并使用移液枪沿着茎部注射3 mL菌液，保湿培养2周，观测新长出的毛状根的荧光表达情况。选取荧光蛋白表达明显的再生毛状根，提取RNA之后反转录为cDNA，对*CsWRKY12*进行荧光定量PCR检测，选取高表达的株系使用300 mmol/L甘露醇和Hoagland培养液分别处理黄瓜毛状根24 h，通过检测黄瓜毛状根中超氧化物歧化酶（SOD）和过氧化物酶（POD）的活性来判断*CsWRKY12*在干旱胁迫中的功能。

1.2.5 过表达*CsWRKY12*拟南芥株系的获得与干旱胁迫处理 将重组表达载体pHB-*CsWRKY12*转化至GV3101，通过农杆菌介导的花序浸染法转化拟南芥。单独收获转基因植株种子，在含有潮霉素（25 mg/L）的培养基上进行筛选，获得T_3代纯合株系进行干旱胁迫处理。

种子萌发及干旱胁迫处理：对表面消毒后的野生型与转基因拟南芥种子，以相同数量分别点播于含300 mmol/L甘露醇的1/2 MS培养基（实验组）与标准1/2 MS培养基（对照组）上。种子经4 ℃春化处理3 d后，移入恒温培养室进行萌发培养，每日观察并记录萌发情况，统计萌发种子数量并计算萌发率。

幼苗干旱胁迫：将表面消毒后的野生型（WT）与转基因拟南芥种子等量播种于1/2 MS培养基上，

经4 ℃低温春化处理3 d后，转移至恒温培养间培养。5 d后，选取根长生长一致的幼苗，用镊子分别移栽至含200 mmol/L甘露醇的1/2 MS培养基（胁迫组）及标准1/2 MS培养基（对照组）中。继续培养7 d后，观察并比较过表达植株与野生型植株的生长表型，测量主根长度，并进行图像记录。

成株干旱胁迫：将野生型与转基因拟南芥种子播种于1/2 MS培养基，培养7 d后移栽至营养土中，随后进行200 mmol/L甘露醇模拟干旱处理，并以正常水分管理组作为对照。处理7 d后观察植株生长状况，并对表型进行图像记录。

1.2.6　生理指标测定　叶片叶绿素含量采用丙酮法测定，相对电导率使用电导率仪进行测定，具体操作参考文献中方法[34]。丙二醛（MDA）和脯氨酸含量、超氧化物歧化酶（SOD）和过氧化物酶（POD）活性测定分别参照南京建成试剂盒说明书进行。

1.2.7　荧光定量PCR（RT-qPCR）　利用荧光染料试剂ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix（诺唯赞，南京）进行实时荧光定量PCR分析，反应体系参考相应说明书。使用Roche LightCycler 480 System qPCR仪进行实时荧光扩增。按照以下程序进行RT-qPCR反应：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性10 s，60 ℃退火延伸30 s，循环40次。基因相对表达量采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$相对定量法进行计算[35]，分别以黄瓜肌动蛋白（*Cs-Actin*）和拟南芥肌动蛋白（*AtActin*）基因作为内参，其对应引物序列见附表1。

1.2.8　数据分析　以上所有实验重复3次，利用SPSS Statistics 25进行显著性分析，采用单因素分析LSD多重比较法检验数据是否存在显著性差异，GraphPad Prism 9绘制统计图。

2　结果

2.1　*CsWRKY12*的克隆和序列分析

以黄瓜品种‘9930’叶片cDNA为模板，对*CsWRKY12*基因进行PCR扩增，测序结果表明PCR产物与CuGenDB数据库预测的*CsWRKY12*基因ORF序列一致。该基因ORF长度为939 bp，编码312个氨基酸。通过ProtParam网站对CsWRKY12蛋白理化性质进行分析。根据结果推测CsWRKY12蛋白的分子量为34.38 kD，等电点为9.22，总平均亲水性为-0.688，为亲水性碱性蛋白质。利用GSDS网站对*CsWRKY12*基因结构进行分析，结果表明*CsWRKY12*含有4个外显子和3个内含子（图1-A）。进一步对CsWRKY12的氨基酸序列进行分析发现，CsWRKY12只含有1个WRKY结构域，其锌指结构为C2H2型，属于第II类WRKY转录因子（图1-B）。根据CsWRKY12的蛋白序列，在NCBI中进行Blast比对，共下载了14个物种的同源蛋白，对它们进行物种进化关系分析发现，CsWRKY12与冬瓜（*Benincasa hispida*）同源蛋白的亲缘关系最近（图1-C）。

2.2　*CsWRKY12*的组织及干旱响应表达模式

采用RT-qPCR检测黄瓜根、茎、叶、雄花、雌花和果实中*CsWRKY12*基因的表达水平。结果显示（图2-A），*CsWRKY12*在所有被测组织中均有表达，其中雄花中的表达量最高，叶片次之，其他组织中的表达水平相对较低。

进一步通过RT-qPCR分析干旱胁迫下*CsWRKY12*基因的表达模式。结果显示（图2-B），干旱处理3 h后，*CsWRKY12*表达量开始显著上升，在6–24 h期间的表达量是0 h的12.1–14.7倍。由此推测，*CsWRKY12*可能参与黄瓜对干旱胁迫的响应过程。

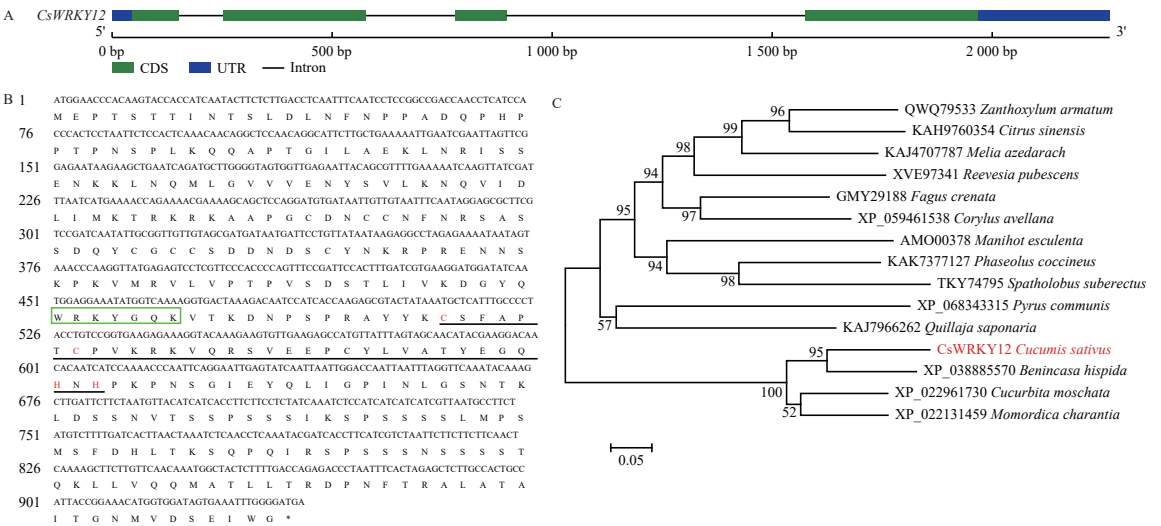
2.3　过表达*CsWRKY12*黄瓜毛状根干旱胁迫分析

为探究*CsWRKY12*在干旱胁迫中的功能，将*CsWRKY12*-GFP载体转化K599发根农杆菌并侵染黄瓜植株，观测其荧光表达情况，有GFP荧光的则为阳性毛状根（图3-A）。选取GFP荧光蛋白表达明显的再生毛状根，提取其RNA，反转录为cDNA后，对*CsWRKY12*的表达量进行RT-qPCR分析，使用野生型黄瓜植株的根部cDNA作为对照。结果（图3-B）显示，过表达毛状根株系L1和L5中*CsWRKY12*的表达量最高，选取这2个株系进行后续干旱胁迫实验。

使用300 mmol/L甘露醇和Hoagland培养液分别处理黄瓜毛状根24 h。结果表明，甘露醇胁迫处理后，过表达株系L1和L5的SOD活性分别为53.56和56.75 U/g，较野生型40.32 U/g分别显著增加32.84%和40.75%（图3-C）。此外，L1和L5的POD活性分别达到127.43和121.42 U/（g·min），较野生型89.57 U/（g·min）显著提升42.27%和35.56%（图3-D）。表明过表达*CsWRKY12*能明显增强植物耐旱性。

2.4　过表达*CsWRKY12*拟南芥转基因植株的鉴定

将构建成功的pHB-*CsWRKY12*过表达载体通过

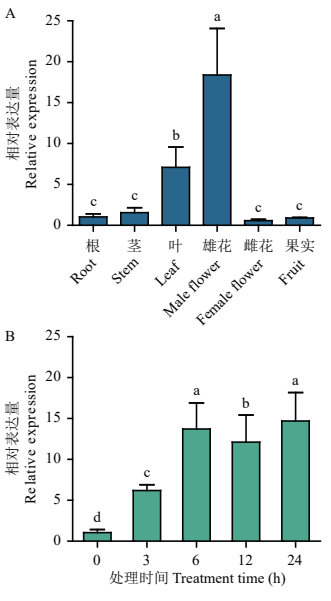


A:*CsWRKY12*基因结构分析;B:*CsWRKY12*编码蛋白序列分析;绿色方框为WRKY结构域,横线为C2H2结构域,保守的C和H用红色标记;C:CsWRKY12及其同源蛋白的系统进化分析

A: Gene structure analysis of *CsWRKY12*. B: Analysis of the encoded protein sequence of *CsWRKY12*. The green box represents the WRKY domain, the black line indicates the C2H2 domain, and the conserved C and H residues are marked in red. C: Phylogenetic analysis of CsWRKY12 and its homologous proteins

图1 *CsWRKY12*基因及其编码蛋白序列分析

Fig. 1 Sequence analyses of the *CsWRKY12* gene and its encoded protein

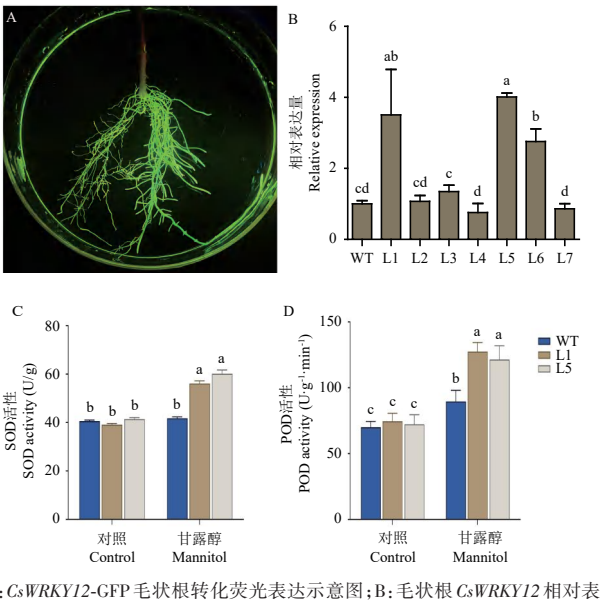


数据为3个重复的平均值±SE。不同小写字母代表显著性水平(P<0.05)。下同

Data are means ± SE of three replicates. Different lowercase letters indicate significant differences at P<0.05. The same below

图2 *CsWRKY12*在黄瓜不同组织(A)及在干旱胁迫不同时间(B)的表达模式

Fig. 2 Expression patterns of *CsWRKY12* gene in different tissues (A) and under different time of drought stress in cucumber (B)



A:*CsWRKY12*-GFP毛状根转化荧光表达示意图;B:毛状根*CsWRKY12*相对表达量测定;C:SOD活性的测定;D:POD活性的测定

A: Schematic diagram of fluorescence expression in *CsWRKY12*-GFP hairy root transformation. B: Determination of relative expression levels of *CsWRKY12* in cucumber hairy roots. C: Determination of superoxide dismutase (SOD) activity. D: Determination of peroxidase (POD) activity

图3 过表达*CsWRKY12*黄瓜毛状根干旱胁迫分析

Fig. 3 Analysis of *CsWRKY12*-overexpressing cucumber hairy roots under drought stress

农杆菌介导的花序浸染法转化野生型拟南芥，采用RT-qPCR方法对各转基因拟南芥株系中*CsWRKY12*的表达水平进行鉴定。结果表明（图4），OE3和OE4这2个转基因株系中*CsWRKY12*的表达量最高，选择其作为后续试验材料。

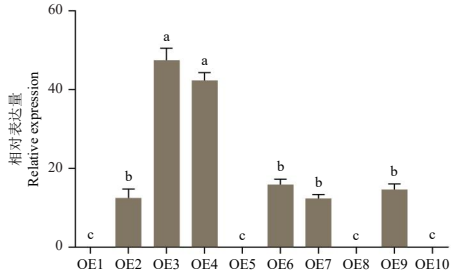


图4　转基因拟南芥株系中*CsWRKY12*基因的表达水平

Fig. 4　Expression levels of the *CsWRKY12* gene in overexpression (OE) transgenic *Arabidopsis* lines

2.5　干旱胁迫下过表达*CsWRKY12*对种子萌发的影响

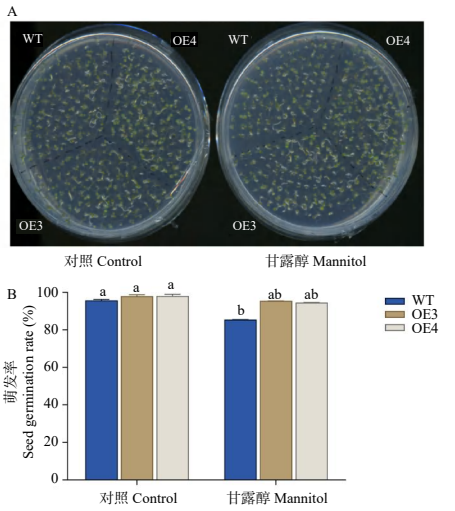
将*CsWRKY12*基因过表达拟南芥株系OE3和OE4的T_3代转基因植株以及野生型种子，同时点播在含有300 mmol/L甘露醇的1/2 MS培养基上，对照组采用1/2 MS培养基，观察各株系的萌发情况（图5-A）。在正常条件下，转基因株系和WT种子的萌发率无明显差异；然而在甘露醇处理模拟干旱胁迫下，过表达植株的萌发率（OE3为95.47%，OE4为94.58%）显著高于野生型（85.42%）（图5-B）。

2.6　干旱胁迫下过表达*CsWRKY12*对幼苗根长的影响

将*CsWRKY12*过表达株系OE3和OE4以及野生型拟南芥种子以相同数量播种于1/2 MS培养基。置于4 ℃冰箱春化3 d后转移至恒温培养间，培养4–5 d后选取根长长势一致的幼苗用镊子移至1/2 MS+200 mmol/L甘露醇和1/2 MS培养基上，7 d后观察过表达植株与野生型植株的生长表型以及测量其根长变化（图6-A）。在甘露醇处理模拟干旱胁迫下，OE3和OE4株系的根长分别达到4.35 cm和4.61 cm，均显著高于野生型植株（2.92 cm）（图6-B）。

2.7　干旱胁迫下过表达*CsWRKY12*对成苗生长的影响

对生长在营养土中的野生型及*CsWRKY12*过表达拟南芥株系（OE3和OE4）进行干旱胁迫处理。结果表明（图7-A），在正常水分条件下，野生型与过表达株系的生长状况未表现出明显差异；经干旱



A：300 mmol/L甘露醇处理模拟干旱胁迫下种子萌发表型；B：干旱胁迫下的种子萌发率测定

A: Phenotype of seed germination under drought stress simulated by 300 mmol/L mannitol treatment. B: Determination of seed germination rate under drought stress

图5　*CsWRKY12*过表达（OE）和野生型（WT）拟南芥在干旱胁迫下的萌发情况

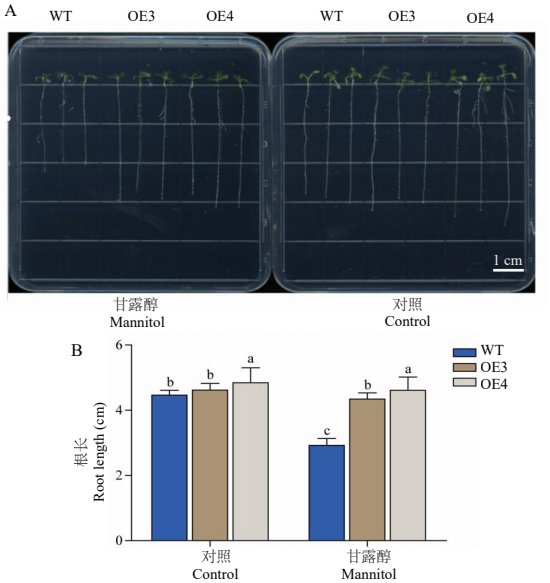
Fig. 5　Seed germination of overexpression (OE) and wild-type (WT) *Arabidopsis* under drought stress

处理后，野生型植株叶片出现明显皱缩与萎蔫，而2个过表达株系的叶片状态均显著优于野生型，表现出较强的干旱耐受性。

分别采集经过对照和干旱处理后的野生型和过表达拟南芥株系的叶片，测定其叶绿素含量、相对电导率、SOD活性、POD活性、MDA含量和脯氨酸含量等一系列生理指标。结果表明，在正常条件下，野生型与过表达株系之间各项生理指标均无显著差异。在干旱处理下，2个转基因株系（OE3和OE4）的叶绿素含量均显著高于野生型（图7-B），相对电导率显著低于野生型（图7-C），SOD和POD活性显著高于野生型（图7-D, E），MDA含量显著低于野生型（图7-F），而脯氨酸含量则显著高于野生型（图7-G）。表明*CsWRKY12*提高了转基因拟南芥植株对干旱胁迫的耐受性。

2.8　*CsWRKY12*促进转基因拟南芥胁迫响应相关基因的表达

干旱胁迫下野生型及*CsWRKY12*过表达拟南芥株系（OE3和OE4）中逆境响应相关基因的转录水平分析结果显示（图8），在正常条件下，过表达株



A：200 mmol/L甘露醇处理模拟干旱胁迫下拟南芥植株根长表型；B：干旱胁迫下拟南芥植株相对根长的测定

A: Root length phenotype of *Arabidopsis* plants under drought stress simulated by 200 mmol/L mannitol treatment. B: Determination of the relative root length of *Arabidopsis* plants under drought stress

图6 *CsWRKY12*过表达（OE）和野生型（WT）拟南芥植株在干旱胁迫下的根长伸长情况

Fig. 6 Analysis of root length in overexpression (OE) and wild-type (WT) *Arabidopsis* plants under drought stress

系中*AtP5CS1*和*AtRD22*的表达水平与野生型相比并无显著差异。而在干旱胁迫下，过表达株系中*AtP5CS1*和*AtRD22*的转录水平均显著高于野生型。表明*CsWRKY12*的过表达能够激活逆境响应相关基因的表达，进而增强转基因拟南芥的抗旱能力。

3 讨论

本研究从黄瓜叶片中克隆得到*CsWRKY12*基因，其编码一个第II类WRKY转录因子。组织表达模式表明*CsWRKY12*在雄花中的表达量最高，其次是叶，在其他组织的表达量较低，表明*CsWRKY12*的表达具有组织特异性，可能还参与花的发育或开花调控。例如水稻OsWRKY11在正常条件下通过激活*OsMADS14*与*OsMADS15*的表达促进开花，而在过表达条件下则通过与OsHd1和OsDTH8形成三元复合物来抑制*Ehd1*的表达，最终导致抽穗期推迟[36]。棉花（*Gossypium hirsutum* L.）GhWRKY46通过直接激活*GhCOL4*、*GhCOL2*、*GhFPF1-like*及*GhFT*等关键基因促进开花，但其功能会受到GhGAI蛋白的互作抑制[37]。在本研究中，*CsWRKY12*基因的表达量在干旱胁迫下有明显的上调，表明其可能在抵御干旱胁迫中发挥功能。

随着全球气候变暖，干旱胁迫已成为限制作物生长和产量的主要因素。目前，其他物种中已有较多*WRKY*家族成员响应干旱胁迫的报道，在黄瓜中研究相对较少。OsWRKY11可通过直接结合干旱响应基因*RAB21*的启动子并激活其转录，从而增强水稻的耐旱性[38]。大豆（*Glycine max* L.）GmWRKY54通过激活ABA与Ca^{2+}信号通路关键基因并促进气孔关闭，从而提高大豆的耐旱性[39]。ArWRKY57和ArWRKY70在质膜上形成蛋白复合体，直接激活*ArLEA5*的转录，共同增强金线莲（*Anoectochilus roxburghii* L.）的耐旱性[22]。在本研究中，过表达*CsWRKY12*的转基因拟南芥在甘露醇模拟的干旱胁迫下，表现出种子萌发率提高和植株生长抑制缓解的表型，且细胞膜受损程度更轻（表现为相对电导率和MDA含量显著降低），表明*CsWRKY12*能够通过维持细胞膜完整性，有效提高植物的抗旱性。

SOD与POD作为植物ROS清除系统的关键酶，其活性在干旱胁迫下的转基因毛状根和拟南芥植株中均显著高于对照，表明CsWRKY12可能通过激活抗氧化酶系统清除ROS以提升干旱适应性。例如，过表达*TaWRKY31*通过上调胁迫相关基因表达、增强抗氧化酶（SOD、POD、CAT）活性并减少ROS与MDA积累，从而有效提高转基因拟南芥的抗旱性[40]。在拟南芥中过表达西葫芦（*Cucurbita pepo* L.）*CpWRKY51*通过显著增强SOD、CAT和POD等抗氧化酶活性以减少ROS积累，并协同调控PYL-PP2C-SnRK2通路，从而正向调控植物的耐旱性[41]。百合（*Lilium regale* L.）LrWRKY16通过直接结合*LrHSP17.2*启动子并激活其表达，通过维持蛋白质稳态和增强ROS清除能力，显著提高植物对高温和干旱的耐受性[42]。脯氨酸作为植物响应逆境的主要渗透调节物质之一，在逆境胁迫下其含量会迅速上升，以提高植株的保水能力。本研究中，转基因拟南芥植株在干旱条件下积累更多脯氨酸，其合成关键基因*AtP5CS1*的转录水平也显著上调。之前有研究表明在拟南芥中过表达橡胶（*Hevea brasiliensis* L.）

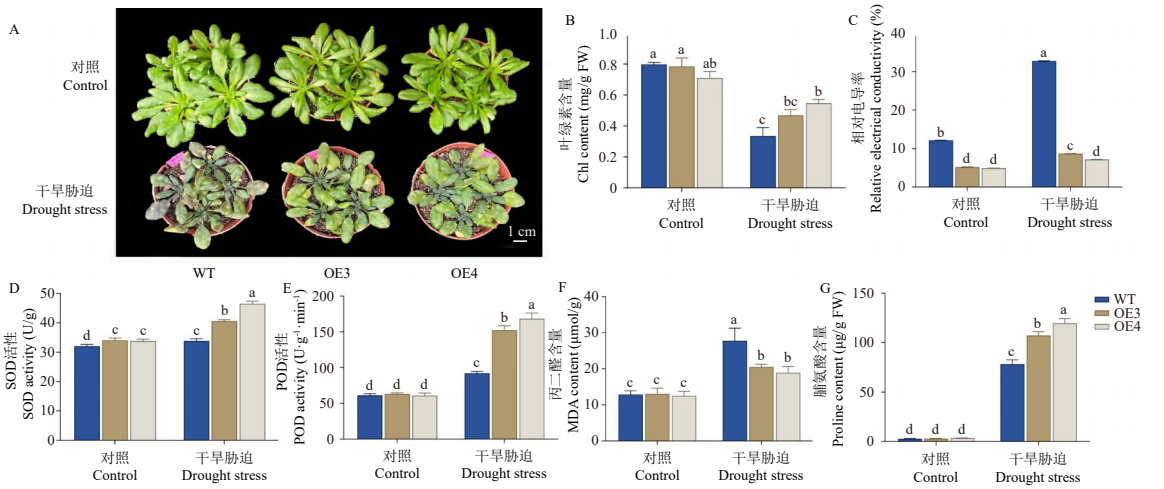


图7　*CsWRKY12*过表达(OE)和野生型(WT)拟南芥植株在干旱胁迫下的表型(A)和逆境生理指标测定(B–G)

Fig. 7　Phenotype (A) and stress-related physiological indices (B–G) in overexpression (OE) and wild-type (WT) *Arabidopsis* plants under drought stress

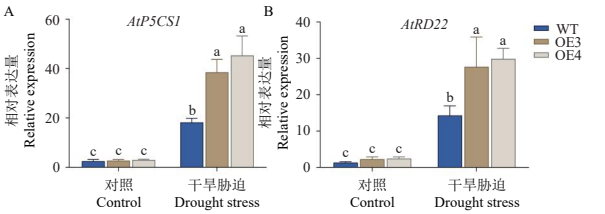


图8　干旱胁迫下*CsWRKY12*过表达(OE)和野生型(WT)拟南芥植株胁迫响应相关基因表达量

Fig. 8　Expression of stress related-genes in overexpression (OE) and wild-type (WT) *Arabidopsis* plants under drought stress

HbWRKY82[43]、密罗木（*Myrothamnus flabellifolia* L.）*MfWRKY70*[44]、大豆*GmWRKY17*[45]等基因，均能通过上调脯氨酸合成关键基因*AtP5CS1*的表达，显著增强转基因植株的耐旱性。综上可知，*CsWRKY12*通过协同调控抗氧化酶活性、促进渗透调节物质合成以及减轻膜脂过氧化，多途径提高植物的抗旱性。下一步将创制过表达和敲除*CsWRKY12*基因的黄瓜材料，以深入探究其调控干旱胁迫的具体分子机制。

4　结论

从黄瓜中克隆*CsWRKY12*基因，其编码312个氨基酸，在雄花和叶片中表达量较高，且干旱处理可显著诱导其表达上调。在干旱胁迫下，过表达*CsWRKY12*的黄瓜毛状根和转基因拟南芥的抗旱能力明显高于对照，表明*CsWRKY12*可能正向调控黄瓜对干旱胁迫的抗性。

文章所有附表数据请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260506103144_NewsFile_45.pdf）。

参考文献

[1] Goyal P, Devi R, Verma B, et al. WRKY transcription factors: evolution, regulation, and functional diversity in plants [J]. Protoplasma, 2023, 260(2): 331-348.

[2] Xia KL, Zhou ZY, Hu YS, et al. Identification of the group III *WRKY* subfamily and preliminary functional characterization of *CsWRKY59* in cucumber [J]. J Plant Biochem Biotechnol, 2025, 34(1): 271-283.

[3] Mahiwal S, Pahuja S, Pandey GK. Review: Structural-functional relationship of WRKY transcription factors: Unfolding the role of WRKY in plants [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 257(Pt 2): 128769.

[4] Ishiguro S, Nakamura K. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, *SPF1* that recognizes *SP8* sequences in the 5′ upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato [J]. Mol Gen Genet, 1994, 244(6): 563-571.

[5] Li TT, Li B, Wang YY, et al. WRKY transcription factors in rice: key regulators orchestrating development and stress resilience [J]. Plant Cell Environ, 2025, 48(11): 8388-8406.

[6] Bataller S, Davis JA, Gu LK, et al. Disruption of the *OsWRKY71*

transcription factor gene results in early rice seed germination under normal and cold stress conditions [J]. BMC Plant Biol, 2024, 24(1): 1090.

[7] Sun ZG, Ji Y, Liu S, et al. The TgWRKY24 transcription factor is involved in releasing seed dormancy by responding to abscisic acid signals in *Tulipa thianschanica* [J]. BMC Plant Biol, 2025, 25 (1): 1494.

[8] Fang X, Wu H, Huang WC, et al. The WRKY transcription factor ZmWRKY92 binds to GA synthesis-related genes to regulate maize plant height [J]. Plant Physiol Biochem, 2024, 207: 108422.

[9] Xie LH, Yan TX, Li L, et al. The WRKY transcription factor AaGSW2 promotes glandular trichome initiation in *Artemisia annua* [J]. J Exp Bot, 2021, 72(5): 1691-1701.

[10] Huang YJ, Pang CJ, Yu YB, et al. Soybean GmWRKY44 transcription factor activates *SOC1* and *LFY* to promote flowering in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell Rep, 2025, 44(10): 226.

[11] Zhang W, Tang SF, Li XY, et al. *Arabidopsis* WRKY1 promotes monocarpic senescence by integrative regulation of flowering, leaf senescence, and nitrogen remobilization [J]. Mol Plant, 2024, 17 (8): 1289-1306.

[12] Wang H, Zhang SH, Feng YC, et al. MdMAPK6-mediated phosphorylation of MdWRKY9 regulates apple fruit ripening through interaction with MdERF5L [J]. Hortic Res, 2025, 12(11): uhaf200.

[13] Fu XQ, Peng BW, Hassani D, et al. AaWRKY9 contributes to light- and jasmonate-mediated to regulate the biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* [J]. New Phytol, 2021, 231(5): 1858-1874.

[14] 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.

[15] Mirzaei L, Abbasi S, Fazli M. WRKY transcription factors enhance plant defense responses against viral pathogens: a review [J]. Funct Plant Biol, 2025, 52(10): FP25093.

[16] Cheng W, Wang N, Li Y, et al. CaWRKY01-10 and CaWRKY08-4 confer pepper's resistance to *Phytophthora capsici* infection by directly activating a cluster of defense-related genes [J]. J Agric Food Chem, 2024, 72(20): 11682-11693.

[17] Shi XT, Xiong YH, Zhang K, et al. The ANIP1-OsWRKY62 module regulates both basal defense and Pi9-mediated immunity against *Magnaporthe oryzae* in rice [J]. Mol Plant, 2023, 16(4): 739-755.

[18] Liu Q, Li X, Yan SJ, et al. OsWRKY67 positively regulates blast and bacteria blight resistance by direct activation of *PR* genes in rice [J]. BMC Plant Biol, 2018, 18(1): 257.

[19] Wang S, Han SY, Zhou XG, et al. Phosphorylation and ubiquitination of OsWRKY31 are integral to OsMKK10-2-mediated defense responses in rice [J]. Plant Cell, 2023, 35(6): 2391-2412.

[20] 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 USA, 2025, 122(10): e2411164122.

[21] Li GZ, Liu J, Wang YY, et al. TaWRKY24-1D, interacts with TaERFL1a, regulates DHAR-mediated ASA-GSH biosynthesis to enhance drought tolerance in wheat [J]. Plant Growth Regul, 2024, 104(2): 713-725.

[22] Jiang WW, Lv AM, Huang YQ, et al. The ArWRKY57-ArWRKY70-ArLEA5 module: Key regulators of drought tolerance in *Anoectochilus roxburghii* [J]. Int J Biol Macromol, 2025, 328: 147596.

[23] Yang Y, Liu J, Zhou XH, et al. Eggplant WRKY26 functions as a positive regulator of cold tolerance by inducing autophagy [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 227: 110188.

[24] Chen S, Liao NN, Bi HY, et al. RsWRKY49 promotes cold tolerance via activating the expression of *RsCBF2* and *RsNR2* in radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. Plant J, 2025, 122(5): e70256.

[25] Wu Z, Li T, Cao X, et al. Lily WRKY factor LlWRKY22 promotes thermotolerance through autoactivation and activation of LlDREB2B [J]. Hortic Res, 2022, 9: uhac186.

[26] 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.

[27] Lu KK, Song RF, Guo JX, et al. CycC1; 1-WRKY75 complex-mediated transcriptional regulation of *SOS1* controls salt stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2023, 35(7): 2570-2591.

[28] Wang XM, Li H, Wang JY, et al. The WRKY transcription factor SbWRKY51 positively regulates salt tolerance of sorghum [J]. Plant Sci, 2026, 362: 112741.

[29] Jiang YZ, Tong SF, Chen NN, et al. The PalWRKY77 transcription factor negatively regulates salt tolerance and abscisic acid signaling in *Populus* [J]. Plant J, 2021, 105(5): 1258-1273.

[30] Zhang MX, Zhao RR, Huang K, et al. The OsWRKY63-OsWRKY76-OsDREB1B module regulates chilling tolerance in rice [J]. Plant J, 2022, 112(2): 383-398.

[31] Luan QQ, Chen CH, Liu MY, et al. CsWRKY50 mediates defense responses to *Pseudoperonospora cubensis* infection in *Cucumis sativus* [J]. Plant Sci, 2019, 279: 59-69.

[32] Zhang Y, Yu HJ, Yang XY, et al. CsWRKY46, a *WRKY* transcription factor from cucumber, confers cold resistance in transgenic-plant by regulating a set of cold-stress responsive genes in an ABA-dependent manner [J]. Plant Physiol Biochem, 2016, 108: 478-487.

[33] Chen CH, Chen XQ, Han J, et al. Genome-wide analysis of the *WRKY* gene family in the cucumber genome and transcriptome-wide identification of WRKY transcription factors that respond to biotic and abiotic stresses [J]. BMC Plant Biol, 2020, 20(1): 443.

[34] Yang YX, Guang YL, Wang F, et al. Characterization of phytochrome-

interacting factor genes in pepper and functional analysis of CaPIF8 in cold and salt stress [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 746517.

[35] 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.

[36] Zhao LR, Liu YW, Zhu Y, et al. Transcription factor OsWRKY11 induces rice heading at low concentrations but inhibits rice heading at high concentrations [J]. J Integr Plant Biol, 2024, 66(7): 1385-1407.

[37] Sun MX, Yang MQ, Dang XY, et al. The GhWRKY46-GhGAI module mediates cotton flowering by regulating the expression of flowering promotion factors [J]. Plant Cell Environ, 2025, 48(7): 5448-5464.

[38] Lee H, Cha J, Choi C, et al. Rice WRKY11 plays a role in pathogen defense and drought tolerance [J]. Rice, 2018, 11(1): 5.

[39] Wei W, Liang DW, Bian XH, et al. GmWRKY54 improves drought tolerance through activating genes in abscisic acid and Ca^{2+} signaling pathways in transgenic soybean [J]. Plant J, 2019, 100 (2): 384-398.

[40] Ge MM, Tang Y, Guan YJ, et al. TaWRKY31, a novel WRKY transcription factor in wheat, participates in regulation of plant drought stress tolerance [J]. BMC Plant Biol, 2024, 24(1): 27.

[41] Xu K, Wang P. CpWRKY51 enhances drought and salt resistance in *Cucurbita pepo* via activating CpPYL2-mediated PYL-PP2C-SnRK2 pathway [J]. J Plant Physiol, 2025, 315: 154652.

[42] Mei P, Tang SK, Ling Q, et al. Dual regulation of thermotolerance and drought tolerance by LrWRKY16 through LrHSP17.2-mediated homeostasis and ROS scavenging in *Lilium regale* [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 229: 110402.

[43] Kang GJ, Yan D, Chen XL, et al. HbWRKY82, a novel IIc WRKY transcription factor from *Hevea brasiliensis* associated with abiotic stress tolerance and leaf senescence in *Arabidopsis* [J]. Physiol Plant, 2021, 171(1): 151-160.

[44] Xiang XY, Chen J, Xu WX, et al. Dehydration-induced WRKY transcriptional factor MfWRKY70 of *Myrothamnus flabellifolia* enhanced drought and salinity tolerance in *Arabidopsis* [J]. Biomolecules, 2021, 11(2): 327.

[45] Liu Y, Cao YP. Overexpression of *GmWRKY17*, a class IIb WRKY transcription factor from *Glycine max*, enhances drought tolerance in *Arabidopsis* plants [J]. Plant Growth Regul, 2024, 104(1): 253-265.

（责任编辑　高洁）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):134-144

蓝莓全基因组SSR引物开发及遗传多样性分析

刘思文[1] 王博伟[1] 邢金杰[1] 王静[2] 李亚东[1] 孙海悦[1*]
（1.吉林农业大学园艺学院,长春 130118; 2.济南市公园发展服务中心百花公园,济南 250100）

摘 要： 【目的】基于蓝莓品种形态易混淆、缺乏精准鉴定体系的问题，通过全基因组SSR位点的发掘及相关特性分析，开发新的SSR标记引物，为蓝莓种质精准鉴定和遗传多样性评价提供支撑。【方法】利用Krait软件对‘Draper’基因组SSR位点进行检索分析，并使用Primer 3.0软件设计引物，结合生物信息学技术初步筛选SSR标记引物。逐步扩大蓝莓种质数量进行PCR扩增，采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和毛细管电泳相结合的方式，筛选高多态性SSR标记引物，并进行蓝莓种质资源的遗传多样性分析。【结果】‘Draper’基因组SSR位点发掘结果显示，共检测到888 906个SSR位点，以二核苷酸重复类型为主，占总SSR位点数的87.8%，三核苷酸次之，占总SSR位点数的6.34%。经生物信息学初步筛选，获得103对SSR标记引物；经多轮电泳筛选，最终获得17对高多态性SSR标记引物。利用这17对引物对64份蓝莓种质资源进行遗传多样性分析，共检测到204个等位基因，有效等位基因数（*Ne*）、Shannon's信息指数（*I*）平均值分别为6.165和1.956；多态信息量（*PIC*）平均值为0.985，表明SSR标记多态性较高。UPGMA聚类分析显示，在Nei's遗传距离0.000 8处，64份蓝莓种质资源可划分为3个聚类群。【结论】揭示了蓝莓基因组中SSR位点的数量和类型特性。获得17对高多态性SSR引物，可用于区分蓝莓种质资源，且品种间遗传多样性较好。

关键词： 蓝莓；全基因组；SSR分子标记；SSR引物；遗传多样性
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1404

Genome-wide Development of SSR Primers and Genetic Diversity Analysis in Blueberry

LIU Si-wen[1] WANG Bo-wei[1] XING Jin-jie[1] WANG Jing[2] LI Ya-dong[1] SUN Hai-yue[1*]
（1. *College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun* 130118; 2. *Baihua Park of Jinan Park Development and Service Center, Jinan* 250100）

Abstract: 【Objective】To address the challenges posed by morphologically ambiguous blueberry cultivars and the lack of a precise identification system, this study aimed to mine genome-wide SSR loci, analyze their characteristics, and develop novel SSR markers, thereby providing a solid foundation for accurate authentication of blueberry germplasm and assessment of genetic diversity. 【Method】SSR loci within the ‘Draper’ genome were mined and analyzed using Krait software, and primers were designed with Primer 3.0. Preliminary screening of SSR marker primers was performed through bioinformatics analysis. PCR amplification was conducted using a gradually expanded blueberry germplasm collection. A combination of non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and capillary electrophoresis was employed to screen for highly polymorphic SSR markers. Subsequently, genetic diversity analysis of blueberry germplasm was carried out using the finally selected highly polymorphic primers. 【Result】A total of 888 906 SSR loci were identified in the ‘Draper’ genome. Dinucleotide repeat motifs were the dominant type, accounting for 87.80% of the total, followed by trinucleotide repeats, which represented 6.34%. Following bioinformatic primer design and preliminary screening, 103 pairs of SSR marker primers were obtained. Subsequent multi-round electrophoretic screening yielded 17 pairs of highly polymorphic SSR markers. These were used to analyze the genetic diversity of 64 blueberry germplasm accessions. A total of 204 alleles were detected. The average effective number of alleles (*Ne*) was 6.165, the average Shannon's information index (*I*) was 1.956, and the average polymorphism information content (*PIC*) was 0.985, indicating that the developed SSR markers

收稿日期：2025-12-23
基金项目：吉林省科技发展计划（20250202007NC），国家自然科学基金项目（32472695）
*通信作者：孙海悦 haiyuesun@jlau.edu.cn

are highly polymorphic. UPGMA cluster analysis showed that the 64 blueberry accessions could be grouped into three distinct clusters at a Nei's genetic distance of 0.000 8.【Conclusion】This study characterized the abundance and motif distribution of SSR loci in the blueberry genome. Seventeen highly polymorphic SSR primer pairs were developed, which proved effective for distinguishing blueberry germplasm accessions. Furthermore, the genetic diversity among blueberry cultivars was found to be high.

Keywords: *Vaccinium* spp.; whole-genome; SSR molecular marker; SSR primer; genetic diversity

蓝莓（*Vaccinium* spp.）为杜鹃花科（Ericaceae）越橘属（*Vaccinium*）多年生灌木，其果实富含花青素等活性成分，具有较强的抗氧化性和优异的营养价值，广受市场青睐[1-2]。我国蓝莓种植规模和产量日益上涨，2024年蓝莓栽培面积增至9.588万hm^2，总产量78万t，已超越美国跃居全球第一。随着蓝莓产业的快速发展，大量的品种陆续申请注册[3-4]，越来越多的蓝莓品种在产业上得到应用，常出现品种混杂、同物异名与同名异物等问题。在我国植物新品种保护的规范程度不断深化的当下[5]，面对传统的田间表型鉴定易受环境条件、发育阶段等多种不确定因素影响的缺点，DNA分子标记技术与DUS测试协同互补，成为品种鉴定的核心技术支撑，对解决蓝莓品种混淆、仿冒等问题至关重要，为蓝莓种质资源高效利用与种质创新提供支撑。

随着现代生物技术的发展，分子标记技术因不受生长环境及发育阶段限制，已成为目前鉴别品种差异、反映遗传变异、进行植物遗传多样性研究的重要手段[6-7]。微卫星标记（simple sequence repeat, SSR）、相关序列扩增多态性（sequence-related amplified polymorphism, SRAP）、扩增片段长度多态性（amplified fragment length polymorphism, AFLP）、单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism, SNP）等多种分子标记技术已被逐步普及利用[8-10]。其中，SSR分子标记虽不是当前最前沿的技术，但凭借多态性丰富、特异性高、成本较低、操作简单和共显性遗传等特性[11]，在园艺植物遗传多样性分析、种质鉴定和分子辅助育种方面得到广泛应用。牛锐敏等[12]、闫锦源等[13]分别利用引物数据库和前人鉴别出的SSR标记对葡萄和杧果的遗传多样性和品种鉴别进行了研究。董清华等[14]、王静等[15]研究学者利用NCBI公共数据库的序列资源开发了全新的SSR引物，实现了物种间遗传多样性分析研究。SSR技术根据序列获取的方式，分为基因组SSR、表达序列标签SSR（EST-SSR）和转录组SSR[16]。目前，基于基因组SSR标记的开发已在浆果类研究中得到应用，且已有成功案例。如苗立祥等[17]基于草莓全基因组开发SSR标记引物，发掘35个高多态性位点可有效用于遗传多样性研究；刘嘉艺等[18]基于毛花猕猴桃基因组，开发并筛选出1对可以实现毛花猕猴桃雌雄植株的早期快速、可靠鉴定的引物。

目前，针对蓝莓全基因组SSR位点的系统性发掘研究较少，且已筛选获得的多态性标记数量有限、丰富度不足以满足目前研究需求[19-20]。但是，随着高通量测序技术的快速发展，更多蓝莓基因组数据被测序发布[21-22]，这为蓝莓SSR标记的规模化开发及育种相关研究提供了宝贵的基因组资源。

本研究以蓝莓品种‘Draper’的基因组为基础，开展SSR位点的系统性发掘。结合非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳与毛细管电泳技术，对发掘的SSR标记引物进行多态性筛选验证和可用性评价，进而探究其在种质资源遗传多样性分析与品种鉴定中的应用效果，为构建蓝莓分子鉴定体系和分子标记辅助育种等提供理论依据与技术支撑。

1　材料与方法

1.1　材料

64份蓝莓种质资源（表1）均取自吉林省长春市的吉林省小浆果遗传育种与创新利用工程研究中心（土壤有机质>5%，pH为4.5-5.5）。于2024年6月、11月2次采集新梢鲜嫩无病虫害的叶片3-6片，液氮速冻，-80 ℃保存备用。

随机选取11份蓝莓种质（‘Draper’‘利宝’‘甜心’‘蓝金’‘北陆’‘瑞卡’‘都克’‘布里吉塔’‘L25’‘Emil’‘YOU’）用于引物的初步筛选。

1.2　方法

1.2.1　DNA提取　采用改良CTAB法[23]提取蓝莓叶片DNA，用超微量分光光度计（IMPLEN，德国）在260和280 nm处测定其浓度与纯度，经1%琼脂糖

表1 供试蓝莓试验材料

Table 1 Experimental materials for blueberry testing

编号 Code	品种名 Cultivar name	编号 Code	品种名 Cultivar name	编号 Code	品种名 Cultivar name	编号 Code	品种名 Cultivar name
1	Draper	17	蓝塔	33	努伊	49	Emil
2	利宝	18	泽西	34	伯灵顿	50	L25
3	甜心	19	雷格西	35	艾玛	51	1502
4	Biloxi	20	博尼法西	36	AF1	52	H5
5	X13	21	赫伯特	37	AF2	53	Y42
6	北春	22	布里吉塔	38	AF3	54	F6
7	North sky	23	托柔	39	Small fruit	55	L29
8	North blue	24	日升	40	Jgdrzej	56	122
9	北陆	25	奥林匹克	41	HL2	57	L11
10	慧蓝	26	早蓝	42	HL3	58	49
11	圣云	27	都克	43	HL4	59	O2
12	蓝金	28	晚蓝	44	HL5	60	L45
13	普特	29	艾玛蓝	45	HL9	61	YOU
14	蓝丰	30	瑞卡	46	贝尔	62	DS01
15	H7	31	考林	47	格瑞萨	63	DS04
16	齐伯瓦	32	Record	48	北卫	64	D15

凝胶电泳检测质量。将其稀释到终浓度100 ng/μL，-20 ℃保存备用。

1.2.2 基因组SSR标记开发和引物设计 从GDV公共数据库（https://www.vaccinium.org）中下载‘Draper’的基因组序列数据，然后利用Krait软件[24]进行SSR位点的发掘，设定参数为：二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸最少重复次数分别为6、5、4、4和4次；SSR位点侧翼序列长度为200 bp，其他参数保持默认不变。

用Krait软件内置的Primer 3.0设计引物，设计参数为：引物GC含量为40%-60%；引物长度为18-24 bp；复性温度为55-65 ℃，上下游引物差<5 ℃；产物预期片段大小为150-350 bp，尽量避免引物二聚体、错配的出现。

1.2.3 SSR标记引物筛选与验证 利用TBtools-Ⅱ软件对发掘的序列进行氨基酸翻译，保留能完整编码且能够正常翻译的序列，后续用NCBI数据库（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）中的保守结构域搜索工具进行二次验证筛选，去掉保守结构域匹配度低的引物。通过氨基酸翻译和保守结构域的验证，既可以确保引物对应序列具备完整编码潜能，避免无效序列，又能从结构保守性层面剔除不具备典型功能域特征的序列。最终得到103对SSR标记引物，交由苏州金唯智生物科技有限公司进行合成。

以随机选取的蓝莓种质DNA进行PCR扩增（ABI, 美国），反应体系为12.5 μL 2×TransFast Taq PCR super Mix（+dye）（TransGen Biotech, 北京）、上下游引物各1 μL（10 μmol/L）、0.5 μL DNA模板（100 ng/μL）和10 μL ddH_2O。反应程序为94 ℃ 3 min；94 ℃ 5 s，55-61 ℃ 15 s，72 ℃ 5 s，35个循环；72 ℃ 5 min，4 ℃保存。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳和6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测，筛选出具有特异性及潜在多态性的引物。随后使用所有供试种质进行扩增，对潜在多态性引物进一步筛选，获得高多态性SSR标记引物，在所有正向引物5′端添加荧光基团，交由生工生物工程（上海）股份有限公司进行荧光引物的合成。

1.2.4 荧光PCR扩增及毛细管电泳分析 利用合成的高多态性荧光引物，对供试蓝莓样本进行PCR扩增，反应体系为0.5 μL 5 mmol/L dNTP（mix）、2.5 μL 10×Taq Buffer（含Mg^{2+}）、0.2 μL Taq Plus DNA聚合酶、上下游引物各0.5 μL（10 μmol/L）（生工，上海）、1 μL DNA模板（20-50 ng/μL），补ddH_2O至25 μL。扩增程序为95 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s，60 ℃

（每个循环递减0.5 ℃）退火30 s，72 ℃ 30 s，10个循环；94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，30个循环；72 ℃ 10 min。使用Applied Biosystem 3730XL基因分析仪（ABI，美国）进行产物检测。运用Genemapper软件分析获得毛细管电泳峰图及等位基因位点大小等信息，完成基因带型分析结果的统计工作，制作相应矩阵用于遗传多样性的相关分析。

1.2.5　遗传多样性分析　采用GenAlex 6.503软件计算等位基因数（number of observed alleles, *Na*）、有效等位基因数（effective number of alleles, *Ne*）、Shannon's信息指数（Shannon's information index, *I*）、观测杂合度（observed heterozygosity, *Ho*）、期望杂合度（expected heterozygosity, *He*）和无偏期望杂合度（unbiased expected heterozygosity, *uHe*）。利用Dataformater软件[25]进行矩阵数据的格式转化后，通过PowerMarker V3.25软件计算每对SSR引物的多态信息含量（polymorphism information content, *PIC*）和供试蓝莓品种间的Nei's遗传距离（*D*）与遗传相似系数（genetic similarity coefficient, *GS*），$Gs=e^{-D}$，使用基于Nei's遗传距离的非加权组平均法（unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA）获得聚类图，经过MEGA导出数据，用ITOL在线平台（https://itol.embl.de）美化。

2　结果

2.1　蓝莓全基因组SSR位点组成与分布特征

基于蓝莓'Draper'基因组数据，利用Krait软件进行SSR位点的分析，结果显示，共检测出888 906个SSR位点。在SSR重复基元中一共有5种类型（表2），其中，以二核苷酸和三核苷酸重复类型所占数目最多，分别为780 503和56 384个，六核苷酸重复最少，仅占6 999个，三者占总SSR位点数目的87.8%、6.34%和0.79%，四核苷酸和五核苷酸数量较少，占比分别为3.17%和1.89%。

三核苷酸、五核苷酸和六核苷酸的平均长度是5种类型中较长的，分别为20.98、21.84和26.94 bp。通过观察单位长度基因组序列中SSR位点相对密度，发现二核苷酸、六核苷酸仍呈现最高和最低值为8 215.99和104.64 bp/Mb，其余依次为三核苷酸、四核苷酸和五核苷酸，分别为656.87、280.49和204.22 bp/Mb。

表2　蓝莓基因组SSR位点分布特征

Table 2　Distribution characteristics of SSR loci in the blueberry genome

类型 Type	数量 Number	百分比 Percentage (%)	平均长度 Average length (bp)	相对密度 Relative density (bp/Mb)
二核苷酸 SSR Di-nucleotide	780 503	87.80	18.96	8 215.99
三核苷酸 SSR Tri-nucleotide	56 384	6.34	20.98	656.87
四核苷酸 SSR Tetra-nucleotide	28 183	3.17	17.93	280.49
五核苷酸 SSR Penta-nucleotide	16 840	1.89	21.84	204.22
六核苷酸 SSR Hexa-nucleotide	6 996	0.79	26.94	104.64
合计 Total	888 906	99.99	106.65	9 462.21

2.2　蓝莓全基因组SSR位点重复类型特征

在SSR重复基元中，5种重复类型共包含50种主要重复基元。其中，二核苷酸重复类型占比最高，三核苷酸重复次之，六核苷酸重复的占比最低，不足0.1%。在所有重复基元类型中，占比超过1%的共8种（表3）。二核苷酸重复中，AA重复数量最多，达386 502个，占总重复类型的43.48%；AG重复次之，共260 068个，占29.26%。三核苷酸重复中，AAG重复数量最多，为18 827个，占2.12%。四核苷酸重复中，AAAT重复数量最高，共14 039个，占总重复类型的1.58%。上述4种重复基元是蓝莓全基因组SSR重复基元的主要类型。

2.3　蓝莓全基因组SSR引物的有效性和特异性筛选

基于发掘的含有SSR位点的序列，利用生物信息学手段初步筛选得到103对SSR标记引物。为验证引物有效性和特异性，分别利用'Draper'和随机挑选的11份蓝莓种质资源DNA进行PCR扩增。结

表3 蓝莓基因组SSR重复基元类型

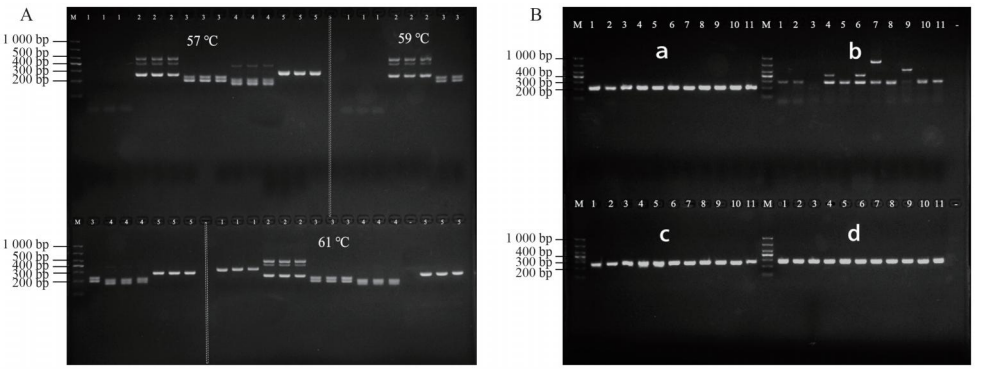
Table 3 Types of SSR repeat motifs in the blueberry genome

类型 Type	重复基元 Repeat motif	数量 Number	百分比 Percentage (%)
二核苷酸 SSR Di-nucleotide	AA	386 502	43.48
二核苷酸 SSR Di-nucleotide	AG	260 068	29.26
二核苷酸 SSR Di-nucleotide	AT	67 003	7.54
二核苷酸 SSR Di-nucleotide	AC	51 501	5.79
二核苷酸 SSR Di-nucleotide	CC	13 530	1.52
三核苷酸 SSR Tri-nucleotide	AAG	18 827	2.12
三核苷酸 SSR Tri-nucleotide	AAT	13 205	1.49
四核苷酸 SSR Tetra-nucleotide	AAAT	14 039	1.58

果显示（图1），编号1仅在61 ℃能够有效扩增出预期条带；编号2-4在引物推荐温度±5 ℃时均扩增出预期条带，但分别在300-500 bp有多余条带产生，可认定为无效扩增或引物不具备进一步特异性检测分析的条件；编号5的引物在3个温度下均存在有效扩增，有效扩增率为91.26%（图1-A）。随后特异性扩增筛选，发现引物a、c、d扩增条带清晰、单一，且与预期扩增片段长度大小一致，视为具有特异性可用于后续多态性的进一步分析；引物b条带杂乱，视为引物不具有特异性舍弃，共筛选到67对特异性引物，占有效扩增引物的71.28%（图1-B）。

2.4 蓝莓全基因组SSR引物的多态性筛选

以条带清晰、品种区分度良好为标准筛选潜在多态性引物。以部分引物的潜在多态性检测结果为例（图2），引物a多态性不佳，引物b条带清晰且多态性良好，最终筛选获得24对潜在多态性引物，它们分布于18条染色体上（图3），占特异性引物的35.82%。以64份供试种质为材料，对24对潜在多态性引物进一步筛选，最终获得17对高多态性引物，占潜在多态性引物的70.83%（图4和表4）。



A:引物有效性筛选(1-5:部分引物,每对引物3次重复);B:引物特异性检测(1-11:11份供试样品;a-d为4对不同引物);M:Marker

A: Primer validity screening (1-5: Different primer pairs, each with three replicates). B: Primer specificity detection (1-11: Eleven tested samples; a-d represent 4 pairs of distinct primers). M: Marker

图1 部分引物的有效性筛选和特异性检测

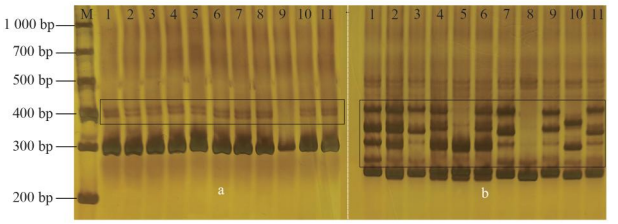
Fig. 1 Effectiveness screening and specificity detection of a subset of primers

2.5 蓝莓全基因组SSR标记的毛细管电泳分析

以引物spSSR16在4份蓝莓种质上扩增的毛细管电泳为例（图5）。结果显示，在‘Draper’品种中扩增产物大小为201.97、203.78、210.65和215.93 bp；在‘北春’中扩增产物大小为204.38和210.09 bp；在‘Emil’中扩增产物大小为202.04、204.82、207.68和210.69 bp；在‘YOU’中扩增产物大小则为210.19和215.88 bp。表明各等位基因表现出明显的特异性，并且引物展现出优良的多态性，可实现蓝莓品种的有效鉴别。

2.6 蓝莓种质资源遗传多样性分析

利用开发的17对SSR标记引物对所有供试蓝莓种质资源进行遗传多样性分析，结果显示（表5），共检测到204个等位基因，平均每对引物检测到12个等位基因，等位基因数（*N*a）变化范围为5-19，有效等位基因数（*N*e）为2.602-10.711，平均为6.165，其中，引物spSSR04、spSSR15、spSSR18和spSSR16检测到的有效等位基因数较多，说明这4对



M：Marker；a–b：为不同引物；1–11：11份供试样品

M: Marker. a–b: Represent different primers. 1–11: 11 test samples

图2　部分引物的潜在多态性检测

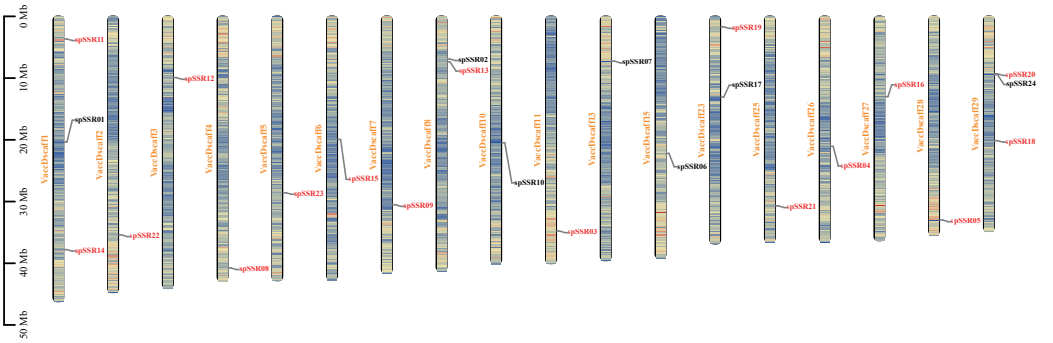
Fig. 2　Detection of potential polymorphism in partial primers

SSR引物变异极为丰富，检测效率更高；Shannon's信息指数（*I*）为1.083–2.558，平均为1.956；观测杂合度（*Ho*）为0.200–1.000，平均为0.836；期望杂合度（*He*）则介于0.616–0.907，平均值为0.809；无偏期望杂合度（*uHe*）为0.623–0.914，平均为0.816；多态信息量（*PIC*）的范围为0.973–0.990，平均为0.985。表明这17对引物具有极高的多态性，可以用于蓝莓遗传多样性分析。

2.7　聚类分析

采用UPGMA法进行聚类分析，结果显示（图6），在遗传距离0.000 8处，可将蓝莓种质资源划分为3大类群。第I聚类群，包含60份样本，其中，高丛蓝莓品种群占比高达88.33%；第II聚类群，由高丛蓝莓品种群和半高丛蓝莓品种群，共计3份种质资源组成；第III聚类群包含‘F6’一份南高丛蓝莓品种。

在遗传相似系数0.003 4处，第I聚类群又可划分成A–J 10个亚群分支，A亚群包括北高丛品种群：南高丛品种群：半高丛品种群=3：1：2；B亚群包括2份北高丛蓝莓种质和2份半高丛蓝莓种质；C亚群由矮丛蓝莓品种‘Emil’组成；D亚群中北高丛



红色：17对多态性引物

Red: 17 pairs of polymorphic primers

图3　24对潜在多态性SSR标记染色体位置分布

Fig. 3　Chromosomal distribution of 24 putatively polymorphic SSR markers

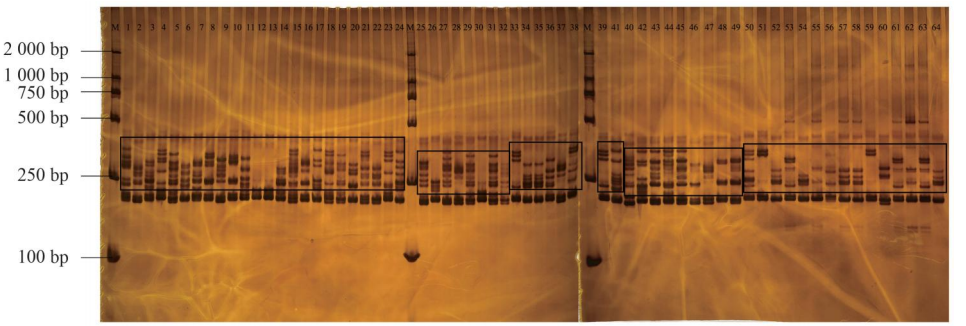


图4　引物spSSR16在64份蓝莓种质资源中的多态性

Fig. 4　Polymorphism of primer spSSR16 in 64 blueberry germplasm resources

表4 17对多态性SSR引物信息

Table 4 Information of 17 polymorphic SSR primer pairs

名称 Name	正向引物序列 Forward primer sequences (5′-3′)	反向引物序列 Reverse primer sequence (5′-3′)	退火温度 Tm (℃)	预期产物 Expected size (bp)	荧光类型 Fluorescent types
spSSR03	CTGTGTCGACCTCTCCAACG	TGAGATCGGTGGCTTTCTCG	57	242	FAM
spSSR04	CTTGGCGATCTCCTCCTTCC	TCAAGGAACAACAGGCCTCC	55	320	HEX
spSSR05	GCTTCCGGTACCTCTCTTCG	TCATCCCGCACAAGAGTTCC	57	283	HEX
spSSR08	ATCTGAAGTCTCCAACGGCG	GCTAACCCGAGTCTGGTTCC	55	262	HEX
spSSR09	TGTGGCTGGAGATGTTGACG	CAAAATGCGATTCCTCCTCCC	57	236	FAM
spSSR11	AAAGGGGACAAGCAACTCCC	CACCACTTCCGGGATAGTGC	57	252	FAM
spSSR12	ACGACGTGAGAAACCACTCC	CTATCCCTCAACCGCGATGG	57	262	HEX
spSSR13	GAGAGAGAGCCAGTCCTTGC	ACGACGAACCAGACGAAACC	57	194	FAM
spSSR14	ACGACGAACCAGACGAAACC	GAGAGAGAGCCAGTCCTTGC	59	209	FAM
spSSR15	TGAACCAGACGAAACCCACC	GAGAGAGAGCCAGTCCTTGC	59	178	FAM
spSSR16	CAAGTCGACAACATGCTCCG	TTTACAAGCACATACGCGCG	59	218	FAM
spSSR18	CTTGGCGATCTCCTCCTTCC	TCAAGGAACAACAGGCCTCC	59	332	HEX
spSSR19	TTCCAAAACCACCAAACGCC	AGAGCAATGTGGTAGCCAGG	55	326	HEX
spSSR20	GGCTTACAGCTCCTCCATGG	GGTGATGAGAGAGAGCCAGG	59	175	FAM
spSSR21	CTATCCCTCAACCGCGATGG	ACGACGTGAGAAACCACTCC	59	268	HEX
spSSR22	TGTGCATCCAAACCTTGAGC	TGTGGTGGTGGTTATGGAGG	59	238	FAM
spSSR23	GAGGCGGTAGTACATGTGGG	CTCTCAACTCCCCTTCAGCC	57	340	HEX

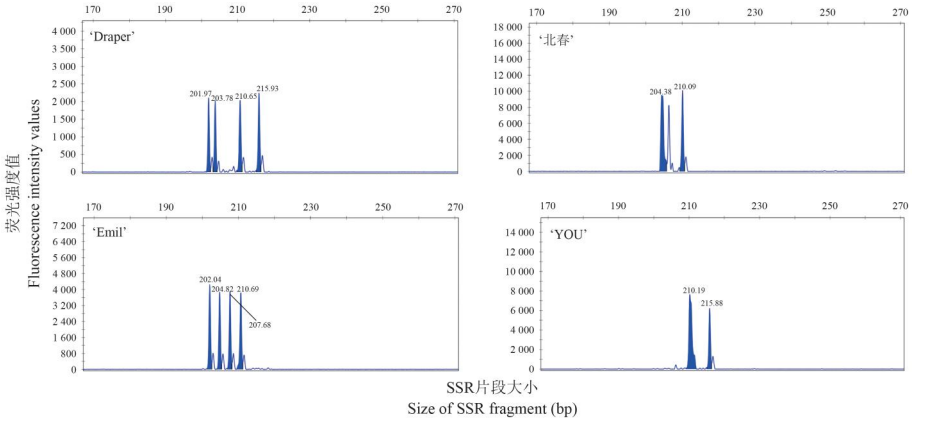


图5 spSSR16在4份蓝莓种质资源中的毛细管电泳图

Fig. 5 Capillary electrophoresis profile of spSSR16 in four blueberry germplasm resources

和半高丛品种群为5∶1；E亚群由北高丛、南高丛品种群共12份蓝莓种质组成；F亚群北高丛品种群∶南高丛品种群=5∶1；G亚群包含北高丛品种群∶南高丛品种群∶半高丛品种群=2∶3∶1；H亚群全部为北高丛品种群；I亚群为北高丛和南高丛品种群共计3份蓝莓种质；J亚群中北高丛∶南高丛∶半高丛品种群=9∶2∶1。表明品种间亲缘关系整体分布较远，但是存在部分品种群被划分至同一类群的情况，推测长期优良性状的选择育种使得这些品种遗传背景变得极为相似而被归为一类。

3 讨论

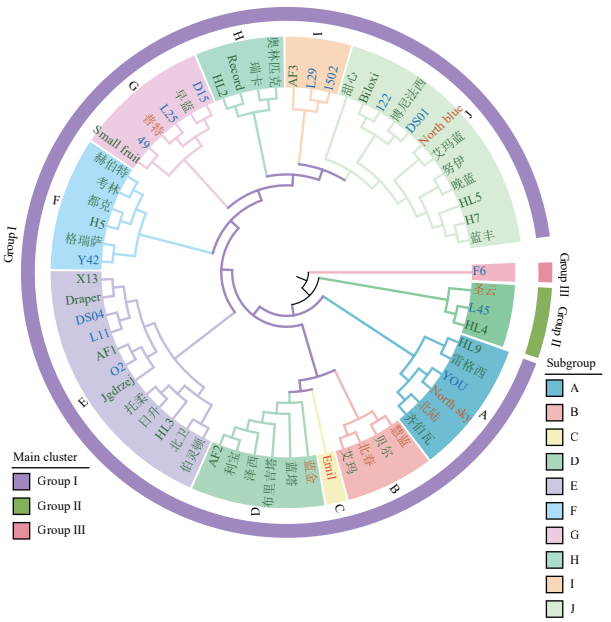
3.1 基因组中SSR位点分布与组成特征

蓝莓全基因组测序与组装水平的提升为SSR标

表5　17对SSR引物在64份蓝莓种质中的遗传多样性

Table 5　Genetic diversity of 17 SSR primer pairs in 64 blueberry germplasms

名称 Name	等位基因数 *Na*	有效等位基因数 *Ne*	Shannon's信息指数 *I*	观测杂合度 *Ho*	期望杂合度 *He*	无偏期望杂合度 *uHe*	多态性信息量 *PIC*
spSSR03	6	3.626	1.405	0.714	0.724	0.730	0.983
spSSR04	16	10.431	2.520	0.750	0.904	0.911	0.990
spSSR05	5	2.602	1.083	0.500	0.616	0.623	0.978
spSSR08	9	4.958	1.786	0.583	0.798	0.807	0.986
spSSR09	9	3.292	1.475	1.000	0.696	0.702	0.973
spSSR11	10	4.698	1.789	1.000	0.787	0.794	0.982
spSSR12	9	4.898	1.735	1.000	0.796	0.803	0.984
spSSR13	17	5.737	2.154	1.000	0.826	0.832	0.988
spSSR14	15	7.008	2.188	1.000	0.857	0.864	0.990
spSSR15	19	10.139	2.558	0.800	0.901	0.908	0.990
spSSR16	14	9.806	2.383	0.667	0.898	0.905	0.989
spSSR18	16	10.711	2.542	0.200	0.907	0.914	0.990
spSSR19	13	6.122	2.099	1.000	0.837	0.844	0.985
spSSR20	13	5.306	1.993	1.000	0.812	0.818	0.980
spSSR21	11	3.924	1.631	1.000	0.745	0.751	0.981
spSSR22	10	5.760	1.913	1.000	0.826	0.833	0.983
spSSR23	12	5.796	1.992	1.000	0.827	0.834	0.983
平均 Mean	12	6.165	1.956	0.836	0.809	0.816	0.985



绿色文字：北高丛品种群；蓝色文字：南高丛品种群；棕色文字：半高丛品种群；红色文字：矮丛品种群

Green text: Northern highbush blueberry group. Blue text: Southern highbush blueberry group. Brown text: Half-highbush blueberry group. Red text: Lowbush blueberry group

图6　64份蓝莓种质资源的UPGMA聚类图

Fig. 6　UPGMA cluster diagram of 64 blueberry germplasm resources

记的全基因组发掘提供了数据基础[21, 26]。本研究基于'Draper'基因组进行SSR位点的全面开发并进行系统分析，共检测出SSR位点888 906个，相对密度高达9 462.21 bp/Mb，高于前人基于越橘属EST序列发掘结果[27]，这可能源于基因组水平与EST序列在覆盖度、重复区域完整性及检测效率上的差异，也说明全基因组分析在SSR位点发掘方面具有优势。碱基重复类型以二核苷酸重复为主，共检测到780 503个，占总SSR位点的87.8%；其次为三核苷酸重复56 384个，占6.34%。这与在无患子[28]和桂花[29]等报道特征相似，但与在草莓中单核苷酸为主的报道不同[30]，反映出物种间基因组SSR的分布与特征的特异性。在二核苷酸和三核苷酸重复中，分别以AA、AG和AAG类型占比最高，这与Zhang等[31]在油茶花基因组和蒋爽等[32]在枇杷全基因组中报道的结果具有相似性，反映了植物SSR组成的某种保守性。本研究基于蓝莓全基因组数据进行大规模的SSR位点特征分析，为越橘属基因组SSR标记的精准开发和高效应用提供更完善的理论依据。未来可以选取更多蓝莓品种、野生越橘等其他越橘属材料进行SSR位点组成特征的对比，系统评价本研究所开发的基因组SSR标记的扩增效率和多态性

能力，进一步揭示重复序列的演化规律。

3.2 SSR位点多态性和品种鉴别

全基因组SSR标记的多态性是评估引物科学性与可用性的关键指标。本研究103对SSR标记引物对蓝莓种质资源进行PCR扩增检测，结果显示94对引物可实现有效扩增，有效扩增率为91.26%，高于越橘有效扩增率67.91%[33]。进一步分析发现17对引物表现出多态性，占总引物的16.5%，低于方茜等[34]在越橘中的25.9%的多态性比率，可能是因为所用的分析材料遗传背景和SSR标记获取方式不同，从而影响了SSR标记的多态性比例。已有研究利用少量引物即可完成种质资源鉴别，俞新华等[35]将30对引物分为4组，用于区分152份西瓜品种，吴仕蔓等[36]利用4对引物完成22份柚类材料的区分，方茜等[34]利用5对SSR引物完成了38份越橘属植物资源的鉴别，具有较高的区分度。相比之下本研究中多态性率相对较低，后续应纳入地理来源更广泛的蓝莓种质，并扩大SSR位点筛选规模，增加引物数量，为未来更多蓝莓品种的鉴别和遗传潜力揭示提供技术支持。

3.3 蓝莓种质资源的遗传多样性与聚类分析

本研究利用筛选的17对高多态性SSR引物对64份蓝莓种质资源进行遗传多样性评价，发现Shannon's信息指数（*I*）平均值1.956；有效等位基因数（*Ne*）平均为6.165；观测杂合度（*Ho*）平均值为0.836；期望杂合度（*He*）平均值为0.809；多态信息量（*PIC*）的平均值为0.985，这些指标整体上高于前人在蓝莓基因组[20]相关研究报道的结果，尤其*PIC*的范围显著高于崔建民等[37]、郭照东等[38]针对部分越橘种质资源遗传多样性分析结果，表明不同SSR标记之间存在多态性差异。这一差异可能源于两方面原因：一是本研究开发标记引物多态性更高，所有标记引物*PIC*数值均满足Haque等[39]提出的高多态性位点判定标准（*PIC*>0.50）；二是供试种质的遗传背景和数量与以往研究不同。

UPGMA聚类分析发现在Nei's遗传距离0.003 4处，将第I大类划分为10个亚群，其中C亚群和H亚群分别将矮丛和北高丛蓝莓品种群单独聚类，与郭瑞雪[33]研究划分结果相似。在D、E、J亚群中北高丛蓝莓的H系列和X系列因相同亲本背景聚类为一支；其余亚群中半高丛与高丛品种群交叉聚类，提示前者携带后者遗传信息，推测种质间存在亲缘关系交叉及育种选择诱发的遗传变异，这与Tailor等[40]通过分子标记证实了蓝莓种质资源中存在基因交流和遗传混合现象，且人工选择显著重塑了栽培品种遗传结构的研究结果相似。后续研究应进一步纳入来源更广泛及野生越橘属材料，扩大种质代表性，并结合精细的群体遗传学方法明确亚群间的遗传边界；同时可评估这17对引物在越橘属其他物种中的通用性，为越橘属种质资源的综合评价和核心标记群体的开发提供更完善的技术支撑。

4 结论

建立了一套稳定的多态性SSR引物筛选流程，可有效提升高多态性SSR引物的筛选效率与准确性，最终获得了17对高多态性SSR引物，这17对引物具有较高的遗传多样性和*PIC*指数。另外，64份种质资源可分为3大类群。

参考文献

[1] Duan YM, Tarafdar A, Chaurasia D, et al. Blueberry fruit valorization and valuable constituents: a review [J]. Int J Food Microbiol, 2022, 381: 109890.

[2] Jin ZW, Huang HZ, Huang HH, et al. The delayed senescence in harvested blueberry by hydrogen-based irrigation is functionally linked to metabolic reprogramming and antioxidant machinery [J]. Food Chem, 2024, 453: 139563.

[3] Yu YY, Xu JD, Huang TX, et al. Combination of beneficial bacteria improves blueberry production and soil quality [J]. Food Sci Nutr, 2020, 8(11): 5776-5784.

[4] 李亚东, 刘成, 魏鑫, 等. 2024年中国蓝莓产业发展报告 [J]. 吉林农业大学学报, 2025, 47(1): 1-14.
Li YD, Liu C, Wei X, et al. Development report of 2024 China blueberry industry [J]. J Jilin Agric Univ, 2025, 47(1): 1-14.

[5] 雷艳珍. 杂交种授权亲本品种权保护问题研究—兼评新《植物新品种保护条例》第7条第3款第3项 [J]. 法治研究, 2025(6): 131-142.
Lei YZ. Research on the protection of parental variety rights for hybrid varieties [J]. Res Rule Law, 2025(6): 131-142.

[6] Cipriani G, Marrazzo M, Di Gaspero G, et al. A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping [J]. BMC Plant Biol, 2008, 8(1): 127.

[7] Daudi H, Shimelis H, Mathew I, et al. Genetic diversity and population structure of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) accessions

using phenotypic traits and SSR markers: implications for rust resistance breeding [J]. Genet Resour Crop Evol, 2021, 68(2): 581-604.

[8] Baruca Arbeiter A, Hladnik M, Jakše J, et al. First set of microsatellite markers for immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don): a step towards the selection of the most promising genotypes for cultivation [J]. Ind Crops Prod, 2021, 162: 113298.

[9] Boutsika A, Sarrou E, Cook CM, et al. Evaluation of parsley (*Petroselinum crispum*) germplasm diversity from the Greek Gene Bank using morphological, molecular and metabolic markers [J]. Ind Crops Prod, 2021, 170: 113767.

[10] Savadi S, Muralidhara BM, Venkataravanappa V, et al. *De novo* transcriptome assembly and its utility in development and characterization of the first set of genic SSR markers in cashew [J]. Ind Crops Prod, 2022, 189: 115734.

[11] 岳林清, 吴怡超, 何星星, 等. 李资源果实主要性状的SSR标记关联分析及指纹图谱构建 [J]. 园艺学报, 2024, 51(11): 2495-2509.
Yue LQ, Wu YC, He XX, et al. SSR marker association analysis and fingerprint construction of main traits of plum fruit [J]. Acta Hortic Sin, 2024, 51(11): 2495-2509.

[12] 牛锐敏, 黄小晶, 沈甜, 等. 基于SSR标记的葡萄种质指纹图谱构建和遗传多样性分析 [J]. 种子, 2025, 44(4): 106-114.
Niu RM, Huang XJ, Shen T, et al. Fingerprints construction and genetic diversity analysis of *Vitis vinifera* germplasm resources based on SSR markers [J]. Seed, 2025, 44(4): 106-114.

[13] 闫锦源, 郑斌, 王松标, 等. 基于荧光SSR标记的杧果控制授粉实生后代父本鉴定 [J]. 果树学报, 2025, 42(6): 1190-1199.
Yan JY, Zheng B, Wang SB, et al. Paternal identification of mango controlled-pollination seedling proge-nies based on fluorescent SSR markers [J]. J Fruit Sci, 2025, 42(6): 1190-1199.

[14] 董清华, 王西成, 赵密珍, 等. 草莓EST-SSR标记开发及在品种遗传多样性分析中的应用 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(17): 3603-3612.
Dong QH, Wang XC, Zhao MZ, et al. Development of EST-derived SSR markers and their application in strawberry genetic diversity analysis [J]. Sci Agric Sin, 2011, 44(17): 3603-3612.

[15] 王静, 赵密珍, 于红梅, 等. 草莓EST-SSR标记的开发与应用 [J]. 果树学报, 2011, 28(4): 721-726.
Wang J, Zhao MZ, Yu HM, et al. Development and utilization of EST-SSR marker in strawberry [J]. J Fruit Sci, 2011, 28(4): 721-726.

[16] Song YP, Jiang XB, Zhang M, et al. Differences of EST-SSR and genomic-SSR markers in assessing genetic diversity in poplar [J]. For Stud China, 2012, 14(1): 106.

[17] 苗立祥, 杨肖芳, 张豫超, 等. 基于草莓全基因组SSR标记的开发和应用 [J]. 分子植物育种, 2021, 19(4): 1210-1222.
Miao LX, Yang XF, Zhang YC, et al. Development of genome-wide SSR marker and application in strawberry [J]. Mol Plant Breed, 2021, 19(4): 1210-1222.

[18] 刘嘉艺, 岳俊阳, 刘永胜. 基于毛花猕猴桃基因组的性别相关SSR分子标记的开发 [J]. 合肥工业大学学报: 自然科学版, 2022, 45(8): 1135-1138, 1146.
Liu JY, Yue JY, Liu YS. Development of sex-related SSR molecular markers based on the genome of *Actinidia eriantha* [J]. J Hefei Univ Technol Nat Sci, 2022, 45(8): 1135-1138, 1146.

[19] Liu YC, Liu S, Liu DC, et al. Exploiting EST databases for the development and characterization of EST-SSR markers in blueberry (*Vaccinium*) and their cross-species transferability in *Vaccinium* spp [J]. Sci Hortic, 2014, 176: 319-329.

[20] 王利平, 沈颖, 陈荣锋, 等. 蓝莓基因组SSR分子标记开发 [J]. 浙江农业科学, 2023, 64(6): 1503-1506.
Wang LP, Shen Y, Chen RF, et al. Development of SSR molecular markers of blueberry genome [J]. J Zhejiang Agric Sci, 2023, 64(6): 1503-1506.

[21] Zeng T, He ZJ, He JF, et al. The telomere-to-telomere gap-free reference genome of wild blueberry (*Vaccinium duclouxii*) provides its high soluble sugar and anthocyanin accumulation [J]. Hortic Res, 2023, 10(11): uhad209.

[22] Wang ZJ, Zhang WC, Zhou YY, et al. Genetic and epigenetic signatures for improved breeding of cultivated blueberry [J]. Hortic Res, 2024, 11(7): uhae138.

[23] Gill K, Negi S, Kumar P, et al. Improved genomic DNA extraction from citrus species using a modified CTAB method[J]. Mol Biol Rep, 2025, 52(1): 638.

[24] Du LM, Zhang C, Liu Q, et al. Krait: An ultrafast tool for genome-wide survey of microsatellites and primer design [J]. Bioinformatics, 2018, 34(4): 681-683.

[25] 樊文强, 盖红梅, 孙鑫, 等. SSR数据格式转换软件DataFormater [J]. 分子植物育种, 2016, 14(1): 265-270.
Fan WQ, Gai HM, Sun X, et al. DataFormater, a software for SSR data formatting to develop population genetics analysis [J]. Mol Plant Breed, 2016, 14(1): 265-270.

[26] Zhao MQ, Shu GP, Hu YH, et al. Pattern and variation in simple sequence repeat (SSR) at different genomic regions and its implications to maize evolution and breeding [J]. BMC Genom, 2023, 24: 136.

[27] 孙海悦, 郭瑞雪, 徐鉴, 等. 越橘属植物EST-SSR分子标记开发及遗传多样性分析 [J]. 植物生理学报, 2018, 54(3): 429-440.
Sun HY, Guo RX, Xu J, et al. Development of EST-SSR molecular markers for *Vaccinium* and genetic diversity analysis [J]. Plant Physiol J, 2018, 54(3): 429-440.

[28] 范佳妮, 蒋丽娟, 李培旺, 等. 无患子全基因组SSR标记开发及遗传多样性分析[J]. 分子植物育种, 2025. https://link.cnki.net/

urlid/46.1068.S.20250530.1500.006.
Fan JN, Jiang LJ, Li PW, et al. Development of SSR markers and genetic diversity analysis of *Sapindus saponaria* genome [J]. Mol Plant Breed, 2025. https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20250530.1500.006.

[29] 朱跃, 张敏, 张成, 等. 桂花全基因组SSR特征分析与引物开发 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2025, 49(5): 174-182.
Zhu Y, Zhang M, Zhang C, et al. Genome wide SSR analysis and primer development of *Osmanthus fragrans* [J]. J Nanjing For Univ Nat Sci Ed, 2025, 49(5): 174-182.

[30] 张咏琦, 王超, 许林林, 等. 野生二倍体草莓的SSR分子标记开发及核心种质的构建 [J]. 园艺学报, 2023, 50(11): 2365-2375.
Zhang YQ, Wang C, Xu LL, et al. Development of SSR molecular markers and construction of core collection of wild diploid strawberry [J]. Acta Hortic Sin, 2023, 50(11): 2365-2375.

[31] Zhang CC, Lin P, Yao XH, et al. Genome-wide development of genomic SSR markers, polymorphism analysis, and dosage-aware SSR fingerprinting in hexaploid *Camellia Oleifera* [J]. BMC Plant Biol, 2025, 25: 1627.

[32] 蒋爽, 张学英, 安海山, 等. 枇杷全基因组SSR标记开发及其多态性研究 [J]. 园艺学报, 2021, 48(5): 1013-1022.
Jiang S, Zhang XY, An HS, et al. Development and analysis of polymorphism of SSR markers in the whole genome of loquat [J]. Acta Hortic Sin, 2021, 48(5): 1013-1022.

[33] 郭瑞雪. 越橘EST-SSR分子标记的开发及遗传多样性分析 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
Guo RX. Development of EST-derived SSR markers and genetic diversity analysis in *Vaccinium* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014.

[34] 方茜, 张园园, 杨钰婷, 等. 越橘叶片转录组SSR发掘及其多态性研究 [J]. 园艺学报, 2018, 45(7): 1359-1370.
Fang Q, Zhang YY, Yang YT, et al. SSR mining and polymorphism analysis in leaf transcriptome of blueberry [J]. Acta Hortic Sin, 2018, 45(7): 1359-1370.

[35] 俞新华, 李超, 哈雪姣, 等. 西瓜品种SSR指纹库构建及应用 [J]. 蔬菜, 2025(12): 37-46.
Yu XH, Li C, Ha XJ, et al. Construction and application of SSR fingerprint database for watermelon varieties [J]. Vegetables, 2025(12): 37-46.

[36] 吴仕蔓, 娄兵海, 陈传武, 等. 应用SSR荧光标记法构建22个柚类品种的分子身份证 [J]. 果树学报, 2023, 40(4): 605-614.
Wu SM, Lou BH, Chen CW, et al. Establishment of molecular identity of 22 pomelo varieties using fluores-cent labeled SSR markers [J]. J Fruit Sci, 2023, 40(4): 605-614.

[37] 崔建民, 刘红霞, 邹荣仟, 等. 越橘种质资源遗传多样性和亲缘关系研究 [J]. 果树学报, 2010, 27(3): 373-378.
Cui JM, Liu HX, Zou RQ, et al. Study on genetic diversity and phylogenetic relationship of germplasm resources about *Vaccinium* spp [J]. J Fruit Sci, 2010, 27(3): 373-378.

[38] 郭照东, 夏秀英, 安利佳, 等. 基于SSR标记的越橘亲缘关系分析及品种鉴定 [J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(5): 1020-1026.
Guo ZD, Xia XY, An LJ, et al. Genetic relationship analysis and cultivar identification of blueberry based on SSR markers [J]. J Plant Genet Resour, 2015, 16(5): 1020-1026.

[39] Haque MS, Saha NR, Islam MT, et al. Screening for drought tolerance in wheat genotypes by morphological and SSR markers [J]. J Crop Sci Biotechnol, 2021, 24(1): 27-39.

[40] Tailor S, Bykova NV, Igamberdiev AU, et al. Structural pattern and genetic diversity in blueberry (*Vaccinium*) clones and cultivars using EST-PCR and microsatellite markers [J]. Genet Resour Crop Evol, 2017, 64(8): 2071-2082.

（责任编辑 李楠）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):145-153

菊花*CmJAZ1*基因负调控干旱胁迫的功能分析

李家群 张煜婷 张新仪 保嘉佳 严瑞*
（宁夏大学葡萄酒与园艺学院，银川 750021）

摘 要： 【目的】探究菊花（*Chrysanthemum morifolium*）在干旱胁迫中*CmJAZ*基因家族特征并验证*CmJAZ1*的功能，为后续深入研究菊花耐旱分子育种提供理论依据。【方法】基于菊花基因组数据，利用生物信息学方法对*CmJAZ*基因家族成员进行筛选鉴定，对其编码蛋白质的特征、系统进化关系等进行分析，并利用实时荧光定量PCR（RT-qPCR）分析其在干旱胁迫和茉莉酸甲酯（MeJA）下的表达模式。将筛选出来的目的基因（*JAZ1*）进行遗传转化获得转基因烟草株系，对其干旱胁迫下生理指标进行测定。【结果】从菊花基因组中鉴定出9个*CmJAZ*基因，其编码蛋白分子量为15.30-34.55 kD，等电点6.44-9.61，均含保守的TIFY结构域和Jas基序，亚细胞定位预测多位于细胞核。序列比对显示，CmJAZ1与青蒿AaJAZ1氨基酸同源性最高（96.38%）。系统发育分析表明其与菊科植物JAZ蛋白亲缘关系较近。表达谱分析发现，20% PEG-6000模拟干旱胁迫和MeJA处理诱导9个*CmJAZ*基因表达，其中*CmJAZ1*表达量上调约9倍。通过农杆菌介导法获得*CmJAZ1*过表达（OE）、基因沉默（RNAi）转基因烟草株系。干旱胁迫下与野生型（WT）相比，RNAi株系相对电导率和丙二醛含量显著降低，超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化物酶（POD）、过氧化氢酶（CAT）活性显著升高，脯氨酸和可溶性糖含量显著增加，而OE株系呈现相反趋势。【结论】*CmJAZ1*基因通过负调控细胞膜稳定性、抗氧化酶活性和渗透调节物质积累影响植株抗旱性，抑制其表达可增强菊花干旱耐受性。

关键词： 菊花；*CmJAZ1*；干旱胁迫；抗氧化酶；渗透调节
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1228

Functional Analysis of Chrysanthemum *CmJAZ1* Gene in Negative Regulation of Drought Stress

LI Jia-qun ZHANG Yu-ting ZHANG Xin-yi BAO Jia-jia YAN Rui*
（*College of Wine and Horticulture, Ningxia University, Yinchuan* 750021）

Abstract: 【Objective】The characteristics of the *CmJAZ* gene family in response to drought stress in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) were studied, and the function of *CmJAZ1* was verified, providing a theoretical basis for further research on drought-resistant molecular breeding of chrysanthemum. 【Method】Based on the chrysanthemum genome data, the *JAZ* gene family members were screened and identified using bioinformatics methods. The characteristics of the encoded proteins and phylogenetic relationships were analyzed. The expression patterns of the *JAZ* gene family under drought stress and methyl jasmonate (MeJA) were analyzed using real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The screened target gene (*CmJAZ1*) was subjected to genetic transformation to obtain transgenic tobacco lines, and the physiological indices of these lines under drought stress were determined. 【Result】A total of 9 *CmJAZ* genes were identified from the chrysanthemum genome. The molecular weights of their encoded proteins ranged from 15.30 to 34.55 kD, with isoelectric points between 6.44 and 9.61. All these proteins contained conserved TIFY domains and Jas motifs, and subcellular localization prediction indicates that they are mostly in the nucleus. Sequence alignment showed that CmJAZ1 shares the highest amino acid homology (96.38%) with AaJAZ1 from *Artemisia annua*. Phylogenetic analysis indicated that it has a close genetic relationship with JAZ proteins from Asteraceae plants. Expression profile analysis revealed that both 20% PEG-6000-simulated drought stress and MeJA treatment significantly induced the expression of the *CmJAZ* genes, among which the expression level of *CmJAZ1* was upregulated by approximately 9-fold. Transgenic tobacco lines with *CmJAZ1*

收稿日期：2025-11-14
基金项目：国家自然科学基金项目（32360770），宁夏重点研发计划项目（2026BBF02015）
*通信作者：严瑞 yanrui2020@sina.cn

overexpression (OE) and RNAi-mediated gene silencing (RNAi) were obtained via the *Agrobacterium*-mediated method. Under drought stress, compared with the wild type (WT), the RNAi lines exhibited significantly reduced relative electrical conductivity and malondialdehyde (MDA) content, significantly increased activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), and catalase (CAT), as well as significantly elevated proline and soluble sugar contents; whereas the OE lines showed the opposite trends.【Conclusion】The *CmJAZ1* gene affects plant drought resistance by negatively regulating cell membrane stability, antioxidant enzyme activity, and the accumulation of osmotic adjustment substances, and inhibiting its expression can enhance drought tolerance in chrysanthemums.

Keywords: chrysanthemum; *CmJAZ1*; drought stress; antioxidant enzymes; osmotic regulation

菊花（*Chrysanthemum morifolium*）是菊科菊属多年生草本植物，为中国传统十大名花之一，具有悠久的栽培历史和丰富的文化内涵。园林小菊是经长期人工杂交育种所得，其花色艳丽、植株低矮、株型紧凑，是理想的园林造景花卉。[1]。*TIFY*基因家族是一类能够编码含有高度保守的TIFTF/YIXG氨基酸序列的蛋白质的基因[2]，该家族共有*TIFY*、*JAZ*、*PPD*、*ZML*4个亚家族[3-4]。*TIFY*亚家族仅拥有1个TIFY结构域，而*JAZ*（jasmonate ZIM-domain）亚家族除TIFY结构域之外，还在C端附近有1个Jas基序（约由27个氨基酸残基组成），JAZ蛋白不结合DNA，它依靠与其他蛋白质互作来行使功能[5]。研究表明，JAZ蛋白除了参与JA信号转导途径，也可作为多个信号通路的阻遏蛋白，参与其他植物激素生物合成或信号转导途径[6]，在植物生长发育和非生物胁迫反应中起着关键作用。如*PnJAZ1*在协调拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）JA和ABA信号通路之间的串扰中起着关键作用，JAZ蛋白与ABI5互作调节种子发芽及耐盐性[7]。OsJAZ9可与OsMY-B30互作，抑制*OsMYB30*的转录激活，而*OsMYB30*可抑制β-淀粉酶（*BMY*）基因的表达，因此OsMY-B30与OsJAZ9相互作用可调控*BMY*基因的表达，进而促进淀粉的分解并提高麦芽糖的含量，达到耐寒的效果[8]。目前，在许多物种中都已经完成了*JAZ*基因家族的鉴定，在核桃（*Juglans regia* L.）、甘薯（*Dioscorea esculenta* Burkill）、木薯（*Manihot esculenta*）、百香果（*Passiflora edulis*）、木豆（*Cajanus cajan* Millsp）等物种中的研究表明，*JAZ*基因家族在植物生长发育调控、激素响应和抗逆方面发挥着不可或缺的作用[9-12]。目前，关于菊花*JAZ*基因在干旱胁迫应答过程中的功能及分子机制尚不清楚。

干旱是较为常见的制约农作物生产的气象因素，它会影响乃至完全终止植物的部分生理过程，进而对植物的生长发育造成较大影响[13]。宁夏拥有得天独厚的土地资源、日照时间长、日温差大、农作物病虫害极少等优点，是发展花卉业的有利地区。然而，宁夏属于温带大陆性干旱、半干旱气候，降水稀少、蒸发强烈，严重影响宁夏地区花卉产业的发展。

本研究将从基因家族鉴定、蛋白性质分析、系统发育分析、组织表达分析、干旱胁迫表达谱分析等方面对菊花*JAZ*基因家族进行探索，克隆*CmJAZ1*并通过烟草遗传转化体系研究其在干旱胁迫响应中的功能，为进一步研究菊花*JAZ*基因的功能及调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究材料为园林小菊‘黄金时代’，试验所用菊花插穗来自学校温室。本氏烟草（*Nicotiana benthamiana*）用于目的基因异源过表达功能研究。

干旱处理：选取长势一致、健康的菊花进行试验，试验前对植株给予充足的水分，保证正常生长。将长度为6 cm左右的‘黄金时代’插穗扦插于混合基质（泥炭∶椰糠∶珍珠岩=2∶3∶2，体积比）的穴盘中，插穗生根并展开8-10片叶后，采集健康的成熟叶、茎和根，并挑选长势一致的扦插苗进行20% PEG-6000和1 mg/L MeJA干旱胁迫处理[14]。每个样品3次生物学重复。

1.2 方法

1.2.1 *CmJAZ*家族成员鉴定与理化性质分析 菊花参考基因组数据（含CDS序列、蛋白质序列及GFF注释文件）源自本课题组前期完成的基因组测序与组装项目，数据可通过（http://210.22.121.250:8880/asteraceae/browse/genomePage/Cmo）公开获取[15]。以拟南芥*AtJAZ*基因家族的蛋白序列作为查询序列，

在菊花基因组数据库中开展同源比对分析，初步筛选得到候选基因。为深入挖掘菊花*JAZ*基因，将At-JAZ序列作为query，借助TBtools软件在菊花基因组中提取*CmJAZ*基因。设定筛选条件为E-value<10^{-5}，去除重复基因后，运用NCBI（网址：https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi）对已鉴定的*CmJAZ*基因进行分析，确认其中存在JAZ结构域，以此验证其属于*JAZ*基因家族。此外，通过Expasy数据库（网址：https://web.expasy.org/compute_pi/）对*CmJAZ*基因编码蛋白的等电点、分子量等理化特性进行分析。

1.2.2　*CmJAZ*基因表达谱及RT-qPCR分析　通过课题组前期转录组和激素进行联合分析，筛选出差异表达的9个*CmJAZ*家族成员，利用RT-qPCR对这些成员在PEG和JA胁迫下的表达量进行分析。采用天根生化科技有限公司RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒提取RNA，并对所用的离心管和枪头进行RNase-free处理，使用Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR （gDNA digester plus）第一链合成试剂盒（11141es60）进行cDNA的合成。利用RT-qPCR对筛选的菊花*JAZ*基因进行表达验证，特异性引物使用Premier-BLAST（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）设计（附表1），内参基因为*CmEF1α*，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因表达量[16]。

1.2.3　*CmJAZ1*基因编码蛋白的氨基酸组成　利用DNAStar软件预测克隆得到的*CmJAZ1*编码氨基酸序列，使用DNAMAN 8软件对*CmJAZ1*基因编码的氨基酸进行多序列比对分析。

1.2.4　CmJAZ1序列比对及系统发育分析　根据获得的CmJAZ1序列及GenBank提交的其他物种氨基酸序列信息，采用MEGA6.0.6软件邻接法（neighbor joining）构建系统进化树。

1.2.5　CmJAZ1蛋白的生物信息学分析　利用ExPASy Protparam Tool（http://web.expasy.org/protparam/）在线数据库根据CmJAZ1编码氨基酸序列预测蛋白的基本理化性质；Protein Structure Prediction Server（https://npsa-prabi. ibcp. fr/cgi-bin/npsa_automat. plpage=npsa_sopma.html）预测CmJAZ1蛋白的二级结构。

1.2.6　CmJAZ1亚细胞定位分析　亚细胞定位载体使用pRI-101-ON-GFP，酶切位点选择*Nde* I和*Bam*H I（用下划线标明），使用Primer Premier 5.0软件设计带有*Nde* I和*Bam*H I位点的引物，对CmTIFY10A进行PCR克隆，使用TaKaRa快速DNA纯化回收试剂盒进行回收纯化。用*Nde* I和*Bam*H I将pRI-101-ON-GFP双酶切后，再将其与含同源臂的CmJAZ1进行同源重组，将重组产物转入大肠杆菌DH5α感受态细胞中（贮存于实验室）。采用冻融法将构建好的载体转化入农杆菌EHA105中，将制备好的农杆菌重悬液注入烟草叶片下表皮，置于完全黑暗环境中28 ℃培养24 h，利用共聚焦激光扫描显微镜观察GFP在烟草叶下表皮的瞬时表达位点。

1.2.7　*CmJAZ1*过表达与RNAi载体的构建

（1）*CmJAZ1*过表达载体的构建。用*Sac* I和*Xba* I对含有pCAMBIA2300表达载体质粒进行双酶切（酶切反应体系见附表2），37 ℃孵育15 min，70 ℃孵育15 min；电泳检测酶切产物，用胶回收试剂盒进行胶回收。将胶回收所得的目的基因片段与pCAMBIA2300载体片段用连接酶进行连接（反应体系见附表3），50 ℃孵育20 min。同源重组反应完成后，将反应液加入100 μL感受态细胞中，热激转化，涂布于卡那霉素固体LB平板上，37 ℃过夜培养（双酶切反应体系见附表2，连接反应体系见附表3）。再进行菌液PCR和电泳检测，将正确条带的菌液送至上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序（菌落鉴定PCR反应体系见附表4，反应程序见附表5）。

（2）*CmJAZ1* RNAi载体的构建。以*CmJAZ1*的CDS为模板，设计正义片段和反义片段的扩增引物，以pUB-GFP-RNAi-Kan正向为骨架引物，上游接头添加序列为：*Sac* I，下游接头添加序列为*Bam*H I；以pUB-GFP-RNAi-Kan-反向为骨架引物上游接头添加序列为：*Xba* I，下游接头添加序列为*Sal* I（附表1）。构建载体步骤同过表达载体构建。

1.2.8　*CmJAZ1*的烟草遗传转化及表型分析　用农杆菌介导的叶盘法将*CmJAZ1*-2300和*CmJAZ1*-RNAi转入普通烟草进行遗传转化，待转基因烟草苗生根并生长健壮后，提取其DNA和RNA进行PCR检测，鉴定获得阳性植株，并通过RT-qPCR检测*CmJAZ1*在各烟草株系中的相对表达水平。最后，将3个高表达的独立阳性转基因烟草株系无菌苗移栽到育苗基质中培养，并进行表型分析，生根培养基添加

100 mg/L Kan。用20% PEG-6000模拟干旱胁迫处理，对野生型和转基因烟草植株处理7 d，观察植株表型，并进行相关生理指标测定。

1.2.9 *CmJAZ1*转基因烟草干旱胁迫下生理指标测定 相对电导率（REC）：采用电导仪法。

相对电导率(%)=R1/R2×100%

式中，R1为处理后的电导率，即细胞未完全破坏时外渗液的电导值，R2为细胞膜完全破裂，全部电解质外渗后的电导值。

丙二醛（MDA）含量：采用硫代巴比妥酸法进行测定。过氧化氢（H_2O_2）含量：使用过氧化氢含量检测试剂盒（Solarbio），按说明书进行测定和计算。超氧化物歧化酶（SOD）活性：采用氮蓝四唑法测定。过氧化物酶（POD）活性：采用愈创木酚法测定。过氧化氢酶活性（CAT）：采用钼酸铵比色法测定。脯氨酸含量（Pro）：使用脯氨酸含量检测试剂盒（Solarbio），按说明书进行测定和计算。可溶性糖含量（SS）：采用蒽酮比色法测定。

1.2.10 数据统计分析 数据采用SPSS 20.0软件进行单因素方差分析和Duncan检测，$P<0.05$时认为差异显著。采用GraphPad Prism 9.1.2软件进行绘图。

2 结果

2.1 *CmJAZ*家族基因鉴定与特征分析

通过TBtools在菊花基因组里鉴定*CmJAZ*基因，利用NCBI CDD数据库验证，再去除冗余序列，最终鉴定出9个*CmJAZ*基因。预测分析*CmJAZ*家族成员的基本理化性质，结果显示（表1），*CmJAZ*基因编码蛋白序列长度差距较大，蛋白序列最长的为CmJAZ7（326 aa），最短的为CmJAZ5（139 aa），分子量为15.30-34.55 kD，平均为23.28 kD。CmJAZ1蛋白的理论等电点小于7，为酸性蛋白；其余CmJAZ蛋白等电点均大于7，为碱性蛋白。CmJAZ1的不稳定系数小于40，为稳定蛋白；其余8个CmJAZ蛋白均为不稳定蛋白。CmJAZ家族蛋白的亲水指数均为负数，表明其均为亲水性蛋白。亚细胞定位预测发现，CmJAZ1、CmJAZ3、CmJAZ4、CmJAZ5、CmJAZ8和CmJAZ9蛋白定位在细胞核，CmJAZ2、CmJAZ6和CmJAZ7定位在叶绿体和线粒体（表1）。

表1 菊花CmJAZ家族成员基本理化性质分析

Table 1 Analysis of basic physicochemical properties of CmJAZ family members in chrysanthemum

蛋白 Protein	氨基酸数目 Amino acid number	分子质量 Molecular weight (Da)	等电点 Isoelectric point	不稳定系数 Instability index	脂肪指数 Aliphatic index	亲水性 GRAVY	亚细胞定位 Subcellular localization	稳定性 Stability
CmJAZ1	219	24 231.17	6.44	39.94	67.76	-0.605	细胞核	稳定蛋白
CmJAZ2	185	20 556.44	9.39	45.24	81.19	-0.450	线粒体	不稳定蛋白
CmJAZ3	185	20 072.58	9.22	45.52	54.38	-0.659	细胞核	不稳定蛋白
CmJAZ4	187	20 653.67	9.39	55.37	73.48	-0.456	细胞核	不稳定蛋白
CmJAZ5	139	15 300.25	7.86	44.13	66.12	-0.428	细胞核	不稳定蛋白
CmJAZ6	237	26 121.55	8.85	46.79	77.05	-0.607	线粒体	不稳定蛋白
CmJAZ7	326	34 548.01	9.36	53.11	64.02	-0.331	叶绿体	不稳定蛋白
CmJAZ8	255	27 669.43	9.25	51.69	62.78	-0.343	细胞核	不稳定蛋白
CmJAZ9	188	20 346.19	9.61	63.34	78.88	-0.387	细胞核	不稳定蛋白

2.2 *CmJAZ*基因表达谱及RT-qPCR分析

为进一步分析*CmJAZ*家族成员是否响应干旱胁迫，本研究通过实时荧光定量检测*CmJAZ*家族基因在20% PEG-6000处理24 h后的表达水平。结果显示（图1-A），PEG处理诱导了*CmJAZ*家族基因的表达，尤其是*CmJAZ1*基因，在PEG处理后，*CmJAZ1*基因表达上调约9倍。表明*CmJAZ1*基因可能在植物应对PEG处理引起的干旱胁迫中发挥关键作用。JAZ蛋白是JA信号途径重要的调控因子，本研究还检测了*CmJAZ*家族基因对MeJA的响应，结果显示（图1-B），MeJA处理诱导*CmJAZ*家族基因的表达，且在MeJA处理下，*CmJAZ1*呈现出强烈的诱导表达，且表达差

异极显著。表明*CmJAZ1*不仅在模拟干旱条件下（PEG处理）表达量显著上调，而且在JA信号途径激活剂MeJA的处理下也有类似的反应。这种双重响应可能意味着*CmJAZ1*在植物适应干旱胁迫和JA信号转导中扮演着重要的角色。

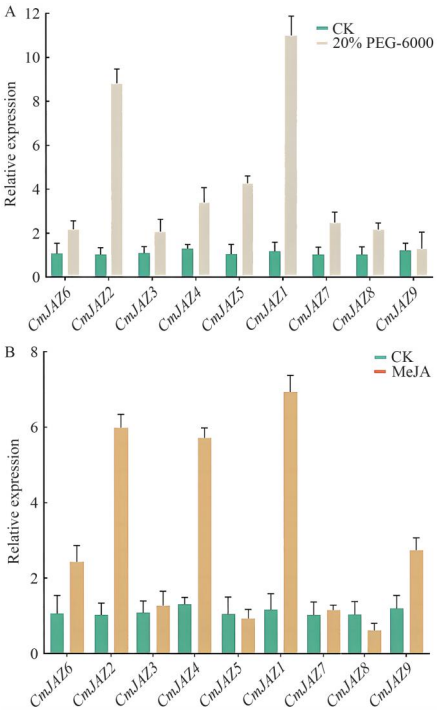


图1　干旱胁迫(A)和MeJA处理(B)下菊花*JAZ*基因表达量

Fig. 1　Expression of *JAZ* gene in chrysanthemum under drought stress (A) and MeJA treatment (B)

2.3　*CmJAZ1*基因的克隆

菊花叶片总RNA电泳结果可见清晰的28S和18S条带（附图1-B），OD_{260}/OD_{280}比值在1.8–2.1之间，表明RNA完整且纯度良好。反转录后PCR扩增获得约600 bp的条带（附图1-C），与预期目的片段（660 bp）大小相符。回收产物连接pMD19-T载体，转化DH5α，经蓝白斑筛选及菌液PCR验证后测序。测序结果与已知*CmJAZ1*基因序列完全一致，表明成功克隆了菊花*CmJAZ1*基因。

2.4　CmJAZ1蛋白生物信息学分析

使用NetPhos在线网站分析蛋白磷酸化位点，分析表明CmJAZ1蛋白中含有19个丝氨酸磷酸化位点、5个苏氨酸磷酸化位点和1个酪氨酸磷酸化位点，第159位氨基酸的Score值最高为0.996（附图2）。

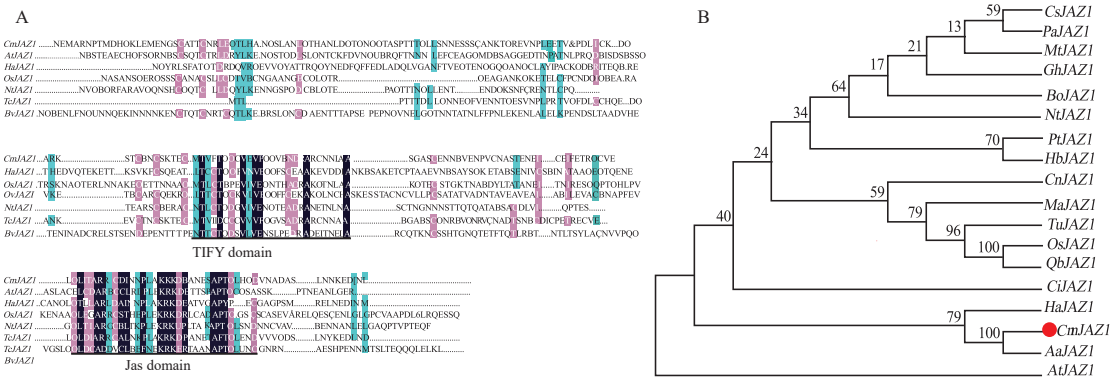
利用Expasy protscale软件分析CmJAZ1蛋白质的亲水性和疏水性，第123位的氨基酸残基的疏水性最强为1.811，第192位的氨基酸残基的亲水性最强为-3.333；另外，在该序列中，亲水性氨基酸累计有167个，疏水性氨基酸累计有43个，亲水性氨基酸的数目大于疏水性氨基酸的数目，因此推测CmJAZ1蛋白属于亲水性蛋白（附图3-A）。

NCBI CDD预测显示，CmJAZ1蛋白序列包含2个保守结构域：TIFY结构域（位于第106–138位氨基酸）和Jas结构域（位于第175–199位氨基酸）。TIFY结构域和Jas结构域是*JAZ*家族基因所特有的（附图1-A）。Sanger测序结果显示，菊花*CmJAZ1*基因CDS序列长度为660 bp，共编码219个氨基酸，其中丝氨酸、亮氨酸、丙氨酸、天冬氨酸的使用频率较高，分别占氨基酸总数的11.40%、9.10%、8.70%、8.20%。菊花CmJAZ1蛋白分子式为$C_{1037}H_{1664}N_{304}O_{341}S_{12}$，分子量为24 231.17 Da，等电点为6.44，脂肪族指数为67.76，不稳定指数为39.94，属于稳定蛋白，带负电荷的残基（Asp+Glu）为28，带正电荷的残基（Arg+Lys）为27，无信号肽，无跨膜结构。

2.5　菊花CmJAZ1蛋白的同源性比对

为明确菊花*CmJAZ1*基因与不同物种的亲缘关系，通过序列比对，在NCBI数据库（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov）中查找拟南芥及其他物种的JAZ蛋白同源序列。将查找到的序列上传至MEGA 5.0软件进行氨基酸比对，并据此生成无根系统发育树。从该系统发育树中可知，菊花CmJAZ1与青蒿（*Artemisia annua*）中的AaJAZ1亲缘关系最为密切（图2-B）。

CmJAZ1与青蒿AaJAZ1、除虫菊TcJAZ1、烟草NtJAZ1以及向日葵HaJAZ1均具有相同的结构域。序列比对结果显示（图2-A），CmJAZ1与黄花蒿AaJAZ1的氨基酸序列同源性最高，达96.38%；与除虫菊TcJAZ11、烟草NtJAZ1、辣椒CaJAZ1、向日葵HaJAZ1的氨基酸序列同源性分别为79.97%、70.42%、68.64%、61.61%；与拟南芥AtJAZ1的氨基酸序列同源性为71.94%。上述结果表明，*JAZ*基因家族在进化过程中具有高度保守性，这种保守性可能与其在激素信号转导和逆境响应中的核心功能相关。



Cs:茶树;Pa:银白杨;Mt:苜蓿;Gh:陆地棉;Bo:甘蓝;Nt:烟草;Pt:毛果杨;Hb:橡胶树;Cn:椰子;Ma:香蕉;Tu:小麦;Os:水稻;Ob:短药稻;Cl:油茶;Ha:向日葵;Cm:菊花;Aa:青蒿;At:拟南芥

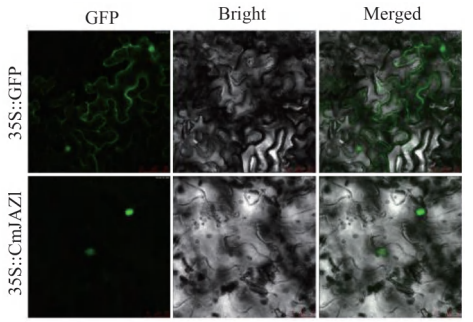
Cs: *Camellia sinensis*. Pa: *Populus alba*. Mt: *Medicago truncatula*. Gh: *Gossypium hirsutum*. Bo: *Brassica oleracea*. Nt: *Nicotiana tabacum*. Pt: *Populus trichocarpa*. Hb: *Hevea brasiliensis*. Cn: *Cocos nucifera*. Ma: *Musa acuminata*. Tu: *Triticum urartu*. Os: *Oryza sativa*. Ob: *Oryza brachyantha*. Cl: *Camellia lanceoleosa*. Ha: *Helianthus annuus*. Cm: *Chrysanthemum morifolium*. Aa: *Artemisia annua*. At: *Arabidopsis thaliana*

图2 菊花CmJAZ1蛋白序列比对(A)与系统进化树构建(B)

Fig. 2 Protein sequence alignment (A) and phylogenetic tree construction (B) of chrysanthemum CmJAZ1

2.6 CmJAZ1亚细胞定位分析

通过共聚焦激光扫描显微镜观察GFP在烟草叶下表皮的瞬时表达位点，结果显示（图3），经GFP-*CmJAZ1*重组载体转化后的烟草叶片表皮细胞，仅在细胞核内可见绿色荧光；而对照组（P35-GFP）叶片的荧光呈弥漫性分布，在细胞核和细胞膜中均能观察到，表明CmJAZ1定位于细胞核。



GFP:绿色荧光通道;Merged:混合场,叠加后的照片;Bright:明场

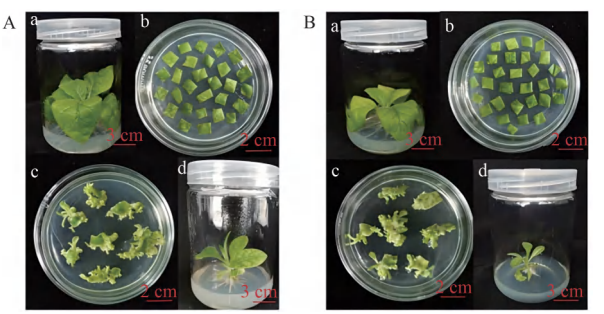
GFP: Green fluorescence channel. Merged: Mixed field, which means superimposed photos. Bright: Bright field

图3 CmJAZ1亚细胞定位

Fig. 3 CmJAZ1 subcellular localization

2.7 转基因烟草株系的获得

采用含有重组质粒的农杆菌菌液，通过叶盘法分别对烟草进行侵染。农杆菌侵染后的烟草叶片，直接转移至含有Kan的选择培养基中，以诱导分化出芽（图4-c）。待芽生长至2-3 cm后，将其插入生根培养基中诱导生根（图4-d）。最终，挑选根系生长旺盛的植株用于后续实验。



A:*CmJAZ1*-2300转化植株的不同时期;B:*CmJAZ1*-RNAi转化植株的不同时期;a:外植体制备;b:外植体预培养;c:愈伤诱导及分化;d:生根培养

A: Different stages of *CmJAZ1*-2300 transformed plants. B: Different stages of *CmJAZ1*-RNAi transformed plants. a: Explant preparation. b: Explant pre-culture. c: Callus induction and differentiation. d: Rooting culture

图4 转基因烟草株系表型

Fig. 4 Phenotypes of transgenic tobacco strains

利用CTAB法提取已获得的卡那霉素（Kan）抗性植株的基因组DNA，以未经转化的植株为对照，利用引物对已提取的转基因植株DNA进行PCR扩增，结果显示（附图4），抗性再生烟草全部扩增出目的条带，且与阳性对照条带大小一致，WT烟草与

空白对照均无该特异性条带。表明*CmJAZ1*基因已成功过表达和沉默，即获得转基因烟草。

2.8　*CmJAZ1*的烟草遗传转化及表型分析

为了验证*CmJAZ1*基因对菊花植株抗旱性的影响，采用20% PEG-6000模拟干旱。选取长势一致的转基因植株和野生型进行PEG处理，每5 d浇灌一次20% PEG-6000，连续浇灌4次。结果显示（图5），经过20 d处理后，转基因植株和野生型植株（WT）的基部叶片均出现黄化萎蔫现象，底部叶片蜷缩。与野生型相比，沉默植株（*CmJAZ1*-RNAi）萎蔫程度较轻，而WT和过表达植株（*CmJAZ1*-OE）普遍出现萎蔫和黄化表型。表明*CmJAZ1*基因表达的沉默会增强烟草对干旱胁迫的耐受性。

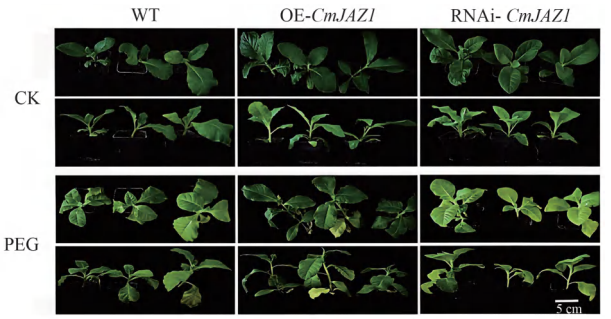


图5　干旱胁迫下烟草表型

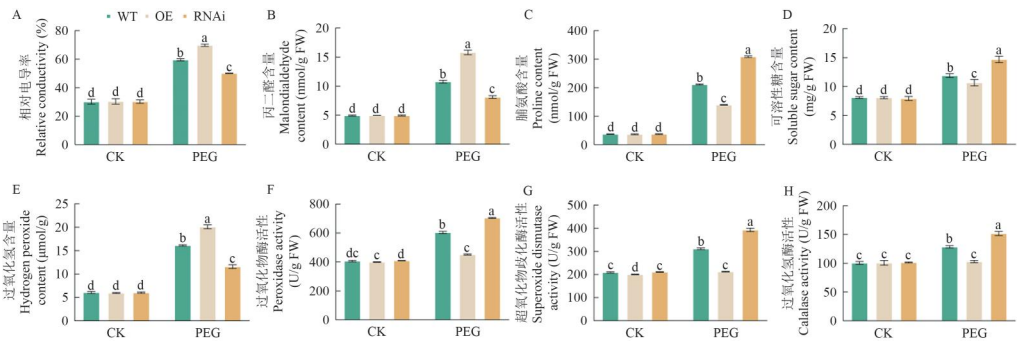
Fig. 5　Phenotype of tobacco under drought stress

2.9　干旱胁迫对*CmJAZ1*转基因植株生理指标的影响

在正常生长条件下（CK），野生型（WT）、过表达株系（OE）与基因沉默株系（RNAi）烟草植株的相对电导率、丙二醛含量、脯氨酸含量、可溶性糖含量、H_2O_2含量以及SOD、POD、CAT活性均无显著差异，表明转基因操作本身并未对植株的细胞膜透性、膜脂过氧化、渗透调节物质积累及氧化还原状态产生明显影响。然而，在PEG模拟干旱胁迫处理后，所有株系的相对电导率、丙二醛和H_2O_2含量均显著升高，同时脯氨酸、可溶性糖含量以及SOD、POD、CAT活性也显著增强，说明干旱胁迫诱导了膜损伤、膜脂过氧化、渗透调节响应及抗氧化酶系统的激活。进一步比较株系间的差异发现：RNAi株系的相对电导率、丙二醛和H_2O_2含量显著低于WT和OE，而其脯氨酸、可溶性糖含量以及SOD、POD、CAT活性则显著高于WT和OE；相反，OE株系的上述指标均呈现相反趋势（即更高的膜损伤和氧化产物，更低的渗透调节物质和抗氧化酶活性）。这些结果一致表明（图6），抑制*CmJAZ1*基因表达可减轻干旱胁迫下的细胞膜损伤和氧化伤害，并增强渗透调节能力和抗氧化酶活性，从而提高植株的抗旱性；而过表达*CmJAZ1*则会加剧膜脂过氧化和氧化损伤，抑制渗透调节与抗氧化防护，降低植株的抗旱性。

3　讨论

*JAZ*基因作为植物特有的茉莉酸（JA）信号通路核心调控因子，在植物的多种关键生理活动中发挥决定性作用，包括茉莉酸信号通路精准调控、生物胁迫防御响应、非生物胁迫适应、生长发育协调、



不同小写字母代表差异显著（$P<0.05$）

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$)

图6　干旱胁迫对转基因菊花生理指标的影响

Fig. 6　Effects of drought stress on physiological indicators of transgenic chrysanthemums

次生代谢物合成调控等，但是关于菊花基因家族成员组成及其生物胁迫响应机制尚不清楚[17]。本研究从菊花基因组中鉴定出9个*CmJAZ*基因，均含有保守的TIFY结构域和Jas基序，这与拟南芥、水稻等物种的*JAZ*基因结构特征一致[18-19]。研究表明，油松基因组中鉴定出53个*JAZ*成员，艾蒿中为18个，油菜中仅10个，反映出*JAZ*基因在不同植物类群中的适应性差异，且拟南芥、水稻等模式植物*JAZ*研究多聚焦基础信号通路，未涉及与观赏植物驯化背景关联[20]。

从系统发育分析来看，*CmJAZ1*与菊科植物青蒿、除虫菊的JAZ蛋白亲缘关系更近，而与禾本科、茄科植物的JAZ蛋白分化明显。这一结果与植物分类学地位相符，揭示*JAZ*基因家族的进化可能与物种特异性逆境适应策略相关[21]。如核桃*JrJAZ*基因家族在进化中形成了与干旱胁迫相关的特异性分支[22]，而本研究中*CmJAZ1*在干旱胁迫下的显著响应，进一步支持了*JAZ*基因家族进化与环境压力适应的关联性。PEG模拟干旱胁迫下，9个*CmJAZ*基因均呈现表达上调，其中*CmJAZ1*表达量上调约9倍，表明*CmJAZ*家族可能普遍参与菊花的干旱响应过程。这一结果与木薯、甘薯等作物的研究相似，例如木薯*MeJAZ*基因在干旱胁迫下显著上调，揭示*JAZ*基因在植物耐旱机制中具有保守性调控作用[9]。另外，*CmJAZ1*对MeJA处理也表现出强烈响应，其表达量在MeJA诱导下显著升高，这揭示了*CmJAZ1*可能作为JA信号通路与干旱胁迫响应的交叉节点。

植物细胞内产生过量的活性氧（ROS）会对植物造成氧化损伤，如蛋白质、核酸和脂质的氧化，进而影响植物的生长和发育[23-24]。与水稻*OsJAZ1*的研究对比显示，*OsJAZ1*主要通过调控渗透调节物质合成响应干旱[10]，而菊花*CmJAZ1*则显著影响抗氧化酶系统（SOD活性上调42.3%，MDA含量下降31.7%），反映出单子叶与双子叶植物*JAZ*基因抗旱机制的物种分异[23]。

JAZ蛋白作为多信号通路的枢纽分子，除JA信号外，还参与ABA、乙烯等激素的信号转导。本研究中*CmJAZ1*在干旱胁迫下的响应，可能涉及JA-ABA信号的协同调控。已有研究表明，JAZ蛋白可与ABA信号核心组件PYLs互作，抑制ABA信号传导，而干旱胁迫往往伴随ABA水平升高[24]。因此，*CmJAZ1*可能通过拮抗ABA信号来调控菊花的耐旱性，这一假设需通过下游基因表达分析和蛋白互作实验进一步验证。下一步将对*CmJAZ1*基因在菊花中的功能进行研究，进一步明确*CmJAZ1*如何通过拮抗ABA信号来调控菊花的耐旱性。

4 结论

从菊花基因组中系统鉴定出9个*CmJAZ*家族成员，其编码蛋白均含保守的TIFY结构域和Jas基序。其中，*CmJAZ1*受20% PEG-6000模拟的干旱胁迫和MeJA处理诱导显著上调表达，且定位于细胞核。抑制*CmJAZ1*表达可显著降低相对电导率、MDA和H_2O_2含量，同时提高SOD、POD、CAT活性及脯氨酸和可溶性糖含量，而过表达则呈现完全相反的趋势。表明*CmJAZ1*是菊花干旱胁迫响应的负调控因子，其作用机制可能涉及同时抑制抗氧化酶系统的激活和渗透调节物质的积累。

文章所有附图附表请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260602161528_NewsFile_16.pdf）。

参考文献

[1] 赵倩茹, 房伟民, 管志勇, 等. 切花小菊49个品种绿心特性分析和综合评价标准的构建 [J]. 园艺学报, 2017, 44(12): 2338-2350.
Zhao QR, Fang WM, Guan ZY, et al. Analysis of green-center characteristics and establishment of green-center comprehensive evaluation standard for 49 spray cut *Chrysanthemum* cultivars [J]. Acta Hortic Sin, 2017, 44(12): 2338-2350.

[2] Bai YH, Meng YJ, Huang DL, et al. Origin and evolutionary analysis of the plant-specific TIFY transcription factor family [J]. Genomics, 2011, 98(2): 128-136.

[3] Chung HS, Niu YJ, Browse J, et al. Top hits in contemporary JAZ: an update on jasmonate signaling [J]. Phytochemistry, 2009, 70(13/14): 1547-1559.

[4] Vanholme B, Grunewald W, Bateman A, et al. The tify family previously known as ZIM [J]. Trends Plant Sci, 2007, 12(6): 239-244.

[5] 魏昕, 刘雨恒, 刘宇阳, 等. 植物JAZ蛋白家族研究进展 [J]. 植物生理学报, 2021, 57(5): 1039-1046.
Wei X, Liu YH, Liu YY, et al. Advances of JAZ family in plants [J]. Plant Physiol Commun, 2021, 57(5): 1039-1046.

[6] Liu SH, Zhang PY, Li CC, et al. The moss jasmonate ZIM-domain

protein PnJAZ1 confers salinity tolerance via crosstalk with the abscisic acid signalling pathway [J]. Plant Sci, 2019, 280: 1-11.

[7] Park S, Im J, Park S, et al. Drought monitoring using high resolution soil moisture through multi-sensor satellite data fusion over the Korean peninsula [J]. Agric For Meteor, 2017, 237: 257-269.

[8] 李春琴, 段桂花, 马笑晴, 等. 外源茉莉酸对稻瘟病菌引起褐点型坏死斑的水稻防御响应的影响 [J]. 南方农业学报, 2020, 51(5): 1053-1061.
Li CQ, Duan GH, Ma XQ, et al. Effects of exogenous jasmonic acids on defense response of resistant rice during the formation of brown necrotic spots caused by *Magnaporthe oryzae* infection [J]. J South Agric, 2020, 51(5): 1053-1061.

[9] 林晨俞, 郭鑫, 于晓惠, 等. 木薯*JAZ*基因的鉴定和对不同胁迫的响应模式 [J]. 热带亚热带植物学报, 2025, 33(2): 187-196.
Lin CY, Guo X, Yu XH, et al. Identification of *Manihot esculenta JAZ* genes and their response pattern to different stresses [J]. J Trop Subtrop Bot, 2025, 33(2): 187-196.

[10] 刘凯, 李津津, 王红霞, 等. 核桃*JrJAZ*基因家族鉴定与转录表达分析 [J]. 河北农业大学学报, 2021, 44(1): 41-50.
Liu K, Li JJ, Wang HX, et al. Identification and transcriptional expression analysis of walnut *JrJAZ* gene family [J]. J Hebei Agric Univ, 2021, 44(1): 41-50.

[11] 黄小芳, 毕楚韵, 陈其俊, 等. 甘薯基因组*JAZ*基因家族的鉴定与分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(11): 3685-3693.
Huang XF, Bi CY, Chen QJ, et al. Identification and analysis of *JAZ* gene family in *Ipomoea batatas* genome [J]. Genom Appl Biol, 2021, 40(11): 3685-3693.

[12] 龚凤鲜, 欧阳浩, 彭昌杨, 等. 百香果*JAZ*基因家族的鉴定及表达模式分析 [J]. 贵州大学学报: 自然科学版, 2024, 41(6): 106-117.
Gong FX, Ouyang H, Peng CY, et al. Identification and expression pattern analysis of *JAZ* gene family in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) [J]. J Guizhou Univ Nat Sci, 2024, 41(6): 106-117.

[13] 郑江伟, 吴珠妹, 郑才龙. 干旱灾害对农业生产的影响及其对策探讨 [J]. 农业与技术, 2019, 39(20): 153-154.
Zheng JW, Wu ZM, Zheng CL. Influence of drought disaster on agricultural production and its countermeasures [J]. Agric Technol, 2019, 39(20): 153-154.

[14] 罗艳. 外源褪黑素缓解园林小菊"绚秋凝红"干旱胁迫的生理效应 [D]. 银川: 宁夏大学, 2023.
Luo Y. Physiological effects of exogenous melatonin in alleviating drought stress in garden *Chrysanthemum* "Xuanqiu ninghong" [D]. Yinchuan: Ningxia University, 2023.

[15] Luo Y, Hu TT, Huo YY, et al. Transcriptomic and physiological analyses reveal the molecular mechanism through which exogenous melatonin increases drought stress tolerance in *Chrysanthemum* [J]. Plants, 2023, 12(7): 1489.

[16] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 1101-1108.

[17] Wu SF, Hu CY, Zhu CG, et al. The MYC2-PUB22-JAZ4 module plays a crucial role in jasmonate signaling in tomato [J]. Mol Plant, 2024, 17(4): 598-613.

[18] 刘德帅, 冯美, 姚磊, 等. 葡萄VvJAZ9蛋白原核表达与多克隆抗体制备 [J]. 核农学报, 2023, 37(6): 1138-1149.
Liu DS, Feng M, Yao L, et al. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of VvJAZ9 protein in *Vitis vinifera* [J]. J Nucl Agric Sci, 2023, 37(6): 1138-1149.

[19] Li WY, Guo HW, Ma MD. Advances in the action of plant hormone ethylene [J]. Sci Sin-Vitae, 2013, 43(10): 854-863.

[20] 杜强, 韩玲玲, 肖秀文, 等. 水稻*DUF760*基因家族的全基因组鉴定与表达谱分析 [J]. 华北农学报, 2023, 38(1): 1-8.
Du Q, Han LL, Xiao XW, et al. Genome-wide identification and expression profile analysis of *DUF760* gene family in rice [J]. Acta Agric Boreali Sin, 2023, 38(1): 1-8.

[21] 杨梅, 臧军蕊, 王召誉, 等. 低温胁迫下黄花苜蓿中15个*JAZ*相关基因表达模式分析 [J]. 分子植物育种, 2023, 21(7): 2211-2219.
Yang M, Zang JR, Wang ZY, et al. Expression pattern analysis of 15 *JAZ* genes related to low temperature response in *Medicago falcata* [J]. Mol Plant Breed, 2023, 21(7): 2211-2219.

[22] 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.

[23] He K, Zhao X, Chi XY, et al. A novel *Miscanthus* NAC transcription factor MlNAC10 enhances drought and salinity tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. J Plant Physiol, 2019, 233: 84-93.

[24] Zhang GW, Xu SC, Hu QZ, et al. Putrescine plays a positive role in salt-tolerance mechanisms by reducing oxidative damage in roots of vegetable soybean [J]. J Integr Agric, 2014, 13(2): 349-357.

（责任编辑　高洁）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):154-163

紫花苜蓿*MsCZF29*基因克隆及耐冻功能分析

范雨馨[1] 任乃芃[2] 轩一芙[1] 臧辉[1] 刘香萍[1*]
（1.黑龙江八一农垦大学动物科技学院,大庆 163319; 2.黑龙江八一农垦大学农学院,大庆 163319）

摘 要： 【目的】CZF锌指蛋白（Zinc finger proteins, ZFPs）在植物响应生物及非生物胁迫中起到重要的调控作用。克隆紫花苜蓿*MsCZF29*基因并分析其耐冻功能，为揭示该基因调控拟南芥耐冻机制奠定基础。【方法】以拟南芥为材料，根据前期紫花苜蓿抗冻转录组分析，筛选得到1个冷冻胁迫响应基因，将其克隆出来并命名为*MsCZF29*，并进行生物信息学分析和表型分析；构建过表达载体通过农杆菌转化法获得转基因植株（OE2-1、OE2-2和OE6-2）。观察冷冻胁迫下T_3代存活率表型、测定生理生化指标和相关冷响应基因的表达量；进行转录自激活活性验证。【结果】*MsCZF29*编码区序列（CDS）全长为1 554 bp，编码517个氨基酸，是不稳定亲水蛋白。亚细胞定位发现该蛋白定位于细胞核，酵母自激活实验发现其具有转录激活活性。异源过表达*MsCZF29*显著增加了冷冻胁迫下拟南芥株系的过氧化氢酶（catalase, CAT）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）和过氧化物酶（peroxidase, POD）活性，降低了相对电导率（REL）和丙二醛（MDA）含量。冷冻胁迫下过表达株系的存活率及生长状态明显优于野生型。【结论】成功克隆*MsCZF29*基因，其过表达在冷冻胁迫过程中发挥正向调控作用，可提高植物的耐冻性。

关键词： 紫花苜蓿；*MsCZF29*；冷冻胁迫；耐冻性；生理指标

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0186

Cloning and Freezing Tolerance Analysis of the *MsCZF29* Gene in Alfalfa

FAN Yu-xin[1] REN Nai-peng[2] XUAN Yi-fu[1] ZANG Hui[1] LIU Xiang-ping[1*]
（1. *College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing* 163319; 2. *College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing* 163319）

Abstract: 【Objective】CZF zinc finger proteins (ZFPs) play important regulatory roles in plant responses to biotic and abiotic stresses. Cloning the *MsCZF29* gene from alfalfa and analyzing its freezing tolerance function lays a foundation for revealing the regulatory mechanism of this gene in freezing tolerance of *Arabidopsis*. 【Method】Using *Arabidopsis thaliana* as the experimental model, we identified the freezing stress-responsive gene *MsCZF29* based on previous transcriptomic analysis of cold tolerance in *Medicago sativa*. The gene was cloned and designated as *MsCZF29*, and bioinformatics analysis and phenotypic characterization were conducted on it. An overexpression vector was constructed and introduced into plants via *Agrobacterium*-mediated transformation to generate transgenic lines (OE2-1, OE2-2, and OE6-2). Under freezing stress conditions, we evaluated T_3 generation survival rates, measured key physiological and biochemical parameters, and quantified expression levels of relevant cold-responsive genes. Transcriptional autoactivation activity was verified using yeast assays. 【Result】The *MsCZF29* coding sequence (CDS) spans 1 554 bp, encoding 517 amino acids that form a protein which is both unstable and hydrophilic. Subcellular localization confirmed that the protein is localized in the nucleus, while yeast autoactivation assays demonstrated its transcriptional activation capability. Heterologous overexpression of *MsCZF29* significantly enhanced the activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and peroxidase (POD) in *Arabidopsis* lines under freezing stress, while simultaneously reducing relative electrical conductivity (REL) and malondialdehyde (MDA) content. Transgenic lines exhibited markedly higher survival rates and superior growth status compared to wild-type plants under freezing stress conditions. 【Conclusion】We successfully cloned *MsCZF29* gene, demonstrating that its overexpression

收稿日期：2026-02-06
基金项目：农业生物育种国家科技重大专项（2022ZD04012）
*通信作者：刘香萍 lxp3885@126.com

exerts a positive regulatory effect during freezing stress responses, thereby enhancing plant freezing tolerance.

Keywords: alfalfa; *MsCZF29* gene; freezing stress; freezing resistance; physiological indicators

紫花苜蓿是豆科属的多年生草本植物，是世界上种植最为广泛的牧草[1]，因其产量高，适口性好，且富含粗蛋白、碳水化合物和矿物质等营养物质，是反刍动物主要的蛋白质饲料来源，在我国畜牧业中占据着十分重要的地位[2-3]。低温是紫花苜蓿能否安全越冬的重要因素[4]，低温主要包括寒冷（0–15 ℃）和冷冻[5]（<0 ℃），低温会限制紫花苜蓿的生长发育，导致植物细胞膜通透性增加、光合作用效率下降、活性氧（reactive oxygen species，ROS）的清除能力下降，甚至会影响基因的表达和蛋白合成[6]。事实上，冷冻会比寒冷造成的危害更大，冷冻损伤始于细胞外冰核，冰核生长并形成冰晶扩散到质外体中致使细胞脱水死亡[7]。

转录因子（transcription factors, TFs）又称反式作用因子，它可以通过结合启动子区域的顺式作用元件来调控基因的转录水平，一些转录因子也可以通过调节次生代谢途径关键酶基因的转录水平，控制次生代谢物质的合成[8-9]。锌指蛋白（Zinc finger proteins, ZFPs）是一类以锌指基序为特征的蛋白，而它只有通过与锌离子结合才能稳定其结构[10]。锌指蛋白作为转录因子中一个庞大的基因家族，可以根据其锌指序列和功能不同分为9大类：C2H2、C2HC、C2HC5、C3H、C3HC4、C4、C4HC3、C6、C8。在以往的报道中发现C2H2-ZFPs参与植物生长发育、响应逆境胁迫和激素传导等。例如，苹果C2H2-ZFPs参与盐、低温和干旱胁迫等多种胁迫[11]。鸭茅*Dg-ZFP125*参与盐胁迫[12]。水稻（*Oryza sativa*）中的*OsZFP36*和*OsZFP179*在氧化和盐胁迫下发挥作用[13-14]。大量研究表明，拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）*AtZFP3*干扰脱落酸和光信号的正常传导[15]。C2H2锌指蛋白与植物的耐寒功能有较强关联。转番茄（*Solanum lycopersicum*）*SlCZFP1*基因的拟南芥和水稻能够响应低温胁迫下相关基因的表达，提高耐寒性[16]。香蕉（*Musa acuminata* Colla）中过表达*MaC2H2-2*和*MaC2H2-3*会显著抑制冷信号的传导，降低香蕉的耐寒性[17]。矮牵牛（*Petunia* × *hybrida*）[18] *PhZFP1*通过调控半乳糖苷合成酶（GolS）基因*PhGolS1-1*的表达影响半乳糖苷的合成，从而提高矮牵牛的耐寒性。目前，对C2H2型的锌指蛋白研究最多，相对来说，C3H型锌指蛋白仅占0.8%，对其功能的研究相对较少[19-20]。相关报道显示，编码C3H型蛋白的基因在种子发芽，叶片、器官发育，响应非生物胁迫等方面起着重要的作用[21-22]。拟南芥*AtTZF1*在未冷驯化前，过表达植株的存活率显著高于野生型植株[23]。在响应干旱胁迫中，水稻*OsC3H47*过表达株系会显著增强对干旱和盐胁迫的耐受性[24]。

通过对课题组紫花苜蓿转录组测序结果分析，发现大量基因在冷冻胁迫下显著差异表达[25]。其中，C3H型锌指蛋白基因*MsCZF29*在受到冷冻胁迫后显著上调，表明其可能参与了紫花苜蓿响应冷冻胁迫的调控。本研究克隆*MsCZF29*基因，通过异源过表达*MsCZF29*探究其对拟南芥耐冻性的影响。为深入解析*MsCZF29*介导的紫花苜蓿耐冻机制及通过基因工程技术创制高耐寒紫花苜蓿新种质提供了基因资源。

1　材料与方法

1.1　材料

试验中所用的紫花苜蓿‘东农1号’，拟南芥哥伦比亚生态型Col-0，本氏烟草均由黑龙江八一农垦大学牧草种质与生态创新实验室提供，试验植物材料均在人工气候室进行培养，光照周期为光照：黑暗=16 h：8 h，培养温度为25 ℃，湿度为60%。拟南芥材料生长至21日龄（21 d）时，分别在冷冻处理前后，取下叶片快速置于液氮冷冻后保存于-80 ℃冰箱中，用于提取RNA及后续生理指标测定。烟草生长至21 d，进行亚细胞定位试验。

1.2　方法

1.2.1　总RNA的提取及反转录合成cDNA　紫花苜蓿总RNA的提取方法按照TIANGEN公司的RNA Easy植物组织RNA快速提取试剂盒（DP452）的说明书进行操作；将RNA反转录为cDNA的方法按照Vazyme公司的HiScript III RT SuperMix for qPCR（+gDNA wiper）试剂盒（R323）的说明书进行操作。

1.2.2 紫花苜蓿*MsCZF29*克隆及生物信息学分析 通过课题组前期的转录组数据（PRJNA1217929）发现基因*MsCZF29*差异表达显著，基于‘新疆大叶’*CZF29*序列，采用Primer 5.0软件设计特异性引物。以‘东农1号’cDNA为模板，使用TKS酶进行PCR扩增克隆。扩增体系为：2×Gflex PCR Buffer 10 μL、TKS Gflex DNA Polymerase 1 μL、*MsCZF29*-F 0.5 μL、*MsCZF29*-R 0.5 μL、植物组织cDNA模板2 μL、ddH_2O 6 μL。扩增条件为：94 ℃ 1 min；98 ℃ 10 s，55 ℃ 15 s，68 ℃ 45 s，30个循环。将PCR扩增目的片段进行琼脂糖凝胶电泳后切胶回收，将胶回收产物克隆到载体pTOPO001 Blunt Simple Cloing Kit上，转化至大肠杆菌，经菌液PCR检测为阳性后送往上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。

利用Expasy-ProtParam tool（ProtParam-SIB Swiss Institute of Bioinformatics Expasy）在线软件对MsCZF29蛋白理化性质进行预测分析。通过在线工具SMART（embl-heidelberg.de）对蛋白保守结构进行分析。

1.2.3 亚细胞定位 亚细胞定位所用表达载体为pCAMBIA1302-*GFP*，将其与*MsCZF29*重新构建为新的表达载体pCAMBIA1302-*MsCZF29-GFP*，经测序比对正确后获得重组表达载体质粒。通过热休克法将重组质粒pCAMBIA1302-*MsCZF29-GFP*和核定位标记载体*AHL22-mRFP*分别转入农杆菌GV3101（pSoup-p19）中，然后将2种农杆菌菌液按比例混合，共同注射至21日龄的烟草叶片背部，暗培养48 h，在激光共聚焦仪（蔡司LSM800，德国）下观察烟草叶片中GFP荧光信号的分布情况。GFP和mRFP的激发波长分别为488 nm和587 nm，发射波长分别为400–580 nm和580–620 nm。

1.2.4 转录自激活活性验证 将*MsCZF29*编码序列克隆到pGBKT7载体中。然后，将构建的载体转化Y2H酵母细胞。在SD/-Trp、SD/-Trp/-His和SD/-Trp/-His（X-α-Gal）培养液中培养3 d，观察转录自激活活性。

1.2.5 拟南芥的遗传转化及阳性植株的筛选和鉴定 将重组质粒pCAMBIA1302-*MsCZF29-GFP*转入大肠杆菌DH5α中，挑取单菌落摇菌测序，经测序比对正确后获得重组表达载体质粒。将重组表达载体转化至农杆菌GV3101中，然后通过浸花法转染拟南芥，将收获的第一批种子命名为T_0代种子。收集种子并消毒后，在固体1/2MS培养基上播种。T_0种子在培养基上发芽后，将T_1幼苗在含有25 μg/mL潮霉素（Hygromycin, Hyg）的培养基上筛选。重复筛选过程，直至获得T_3代纯合体植株。通过基因组PCR、RT-qPCR等技术对转基因拟南芥进行鉴定。

1.2.6 过表达*MsCZF29*转基因拟南芥的耐冻性分析 将野生型和转基因株系T_3代纯合子拟南芥种子用3%次氯酸钠消毒5 min后，用无菌水清洗5次，点播于1/2MS培养基上，在4 ℃冰箱中春化2 d，取出置于室温中正常生长。生长至第7天后进行冷冻处理，先在4 ℃的冰箱中寒冷锻炼2 d，然后以每小时3 ℃梯度降温直至降到-5 ℃，打开培养皿盖子冷冻胁迫处理3 h，放置室温下恢复3 d后观察并拍照，比较野生型和过表达株系幼苗存活率。以相同处理下的野生型作为对照，每个处理设置3个生物学重复。

将培养基上的拟南芥幼苗（7日龄）移栽至含有营养土、蛭石、珍珠岩（1∶1∶1）的混合土壤中，待野生型拟南芥和转基因株系生长至21 d后进行冷冻处理，在4 ℃寒冷锻炼8 h，-5 ℃处理3 h，将胁迫后的拟南芥从冰箱中取出放置在室温下，恢复3 d后，观察并拍照比较野生型和过表达株系成苗的存活率。以未处理的拟南芥作为对照，每个处理设置3个生物学重复。

1.2.7 过表达*MsCZF29*转基因拟南芥在冷冻胁迫下的生理指标测定 分别在未冷冻处理和冷冻处理后选取4周龄的拟南芥野生型（WT）与过表达株系（OE）叶片0.1 g，依照《植物生理学研究技术》[26]进行丙二醛（malondialdehyde, MDA）、相对电导率（relative electrolyte leakage, REL）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）、过氧化物酶（peroxidase, POD）、过氧化氢酶（catalase, CAT）活性的测定。每个生物学重复设置3个技术重复。

1.2.8 过表达*MsCZF29*转基因植株冷响应基因的表达分析 为探究*MsCZF29*表达的调控机制，本研究分析了5个与冷胁迫相关的基因表达水平，包括低温响应基因*AtPOD*、*AtCAT*、*AtCOR47*、*AtCOR6.6*和*AtRD29A*[27]。分别提取转基因植株和野生型叶片的

RNA，以*AtActin*为内参基因，进行荧光定量PCR扩增，每个实验设置3个生物学重复，每个生物学重复由3个技术重复组成，利用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法[28]分析数据。

1.2.9　数据处理　使用Excel 2019进行数据录入及统计。使用IBM SPSS Statistics 27软件进行差异显著性分析。使用Origin 2017软件进行绘图。

2　结果

2.1　MsCZF29蛋白生物信息学分析与基因克隆

利用MEGA软件对MsCZF29蛋白及11个来源于不同物种（蒺藜苜蓿、大豆、拟南芥、玉米、小麦、马铃薯、苹果、棉花、烟草、毛果杨、番茄）的氨基酸序列进行进化树分析。结果显示MsCZF29蛋白与蒺藜苜蓿MtCZF29聚为一类，二者共同与拟南芥AtSZF1聚为一个大分支，表明它们的CZF蛋白在进化上属于同一类群，具有较高的相似性，亲缘关系较近，在功能上可能也存在相似性（附图1-A）。

*MsCZF29*编码区序列（CDS）全长为1 554 bp，蛋白编码517个氨基酸，分子式为$C_{2\,565}H_{3\,994}N_{720}O_{779}S_{30}$，分子量为58.3 kD，理论等电点约为8.45。氨基酸组成中所占比例最大的是丝氨酸（Ser），占11.8%（61/517）；其次是丙氨酸（Ala）和赖氨酸（Lys），占比均为7.2%（37/517）。不稳定系数为47.74，总平均亲水指数（grand average of hydropathicity, GRAVY）为-0.52，该蛋白为不稳定的亲水蛋白（附图1-B）。

为分析紫花苜蓿MsCZF29蛋白的保守结构域，明确该蛋白的功能结构域分布特征。利用在线工具SMART对该蛋白进行分析，MsCZF29蛋白的一级结构的N端包含2个连续的ANK结构域，该结构域通常参与细胞信号转导、蛋白运输等过程。中部区域存在2个连续的Znf_C3H1保守结构域（编码氨基酸分别为203–229位和238–261位），表明MsCZF29蛋白属于典型的C3H型锌指蛋白，推测其可能通过蛋白–蛋白相互作用和RNA结合，参与植物逆境响应调控过程（附图1-C）。

参考低温胁迫处理的‘新疆大叶’紫花苜蓿转录组数据中*CZF*基因的核苷酸序列设计引物，以‘东农1号’叶片组织RNA反转录成的cDNA为模板，进行基因克隆，得到1 554 bp的目的片段，按照同源比对结果将该基因命名为*MsCZF29*（附图1-D）。

2.2　MsCZF29蛋白亚细胞定位

构建亚细胞定位融合表达载体pCAMBIA1302-MsCZF29-GFP，在激光共聚焦显微镜下观察融合表达载体瞬时表达烟草表皮细胞，结果表明（图1），对照组荧光信号在细胞质和细胞核中均有表达，而转入pCAMBIA1302-MsCZF29-GFP融合蛋白的烟草表皮细胞在细胞核内有明显的绿色荧光信号，并与*AHL22-mRFP*标记重叠。说明实验组的核定位不是GFP本身导致的，而是由MsCZF29蛋白决定的，验证了MsCZF29定位于细胞核。

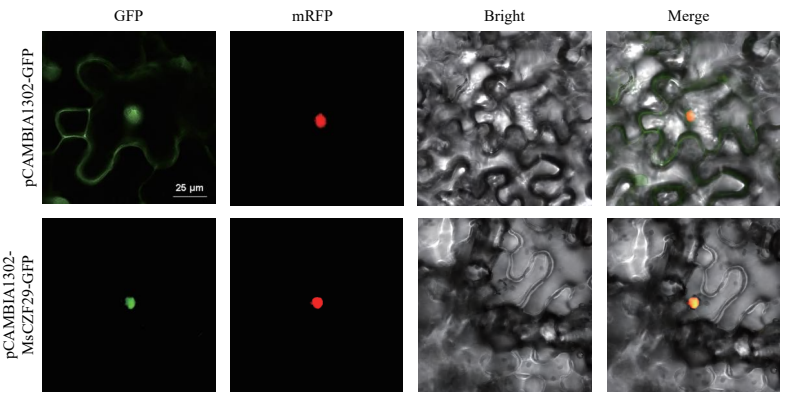


图1　MsCZF29在本氏烟草叶片中的亚细胞定位

Fig. 1　Subcellular localization of MsCZF29 in tobacco leaves

2.3　MsCZF29转录自激活活性验证

在酵母Y2HGold细胞的转化试验中，经pGBKT7质粒转化的菌株仅能在SD/-Trp培养基上生长（图2）。相反，阳性对照pGBKT7-*MsMCU6.2*

和pGBKT7-*MsCZF29*在所有营养缺乏的培养基上均能生长，并在添加X-α-Gal的SD/-Trp/-His培养基上变为蓝色，初步表明*MsCZF29*具有转录激活活性。

2.4 拟南芥的遗传转化及阳性植株的筛选和鉴定

对先前获得的T_1代转基因阳性苗进行Hyg筛选与PCR鉴定，发现OE2-1、OE2-2、OE6-2株系在Hyg培养基筛选分离比达到3∶1（图3-A），符合阳性苗条件。继续筛选直至T_3代，对这3个株系进一步进行PCR鉴定，结果显示（图3-B）转基因型和阳性对照均有条带，阴性对照WT和ddH_2O组均无条带。利用RT-qPCR鉴定转基因植株中*MsCZF29*基因的相对表达量（图3-C），结果显示转基因植株基因表达量高于野生型植株，且OE2-1表达量最高。将最终得到3株转基因型拟南芥命名为OE2-1、OE2-2和OE6-2。

2.5 过表达*MsCZF29*转基因拟南芥的耐冻性分析

为验证*MsCZF29*基因的抗冻功能，对OE与WT株系在相同条件冷冻胁迫下的幼苗期存活率及成苗期表型进行观察。结果显示，-5 ℃下冷冻处理3 h，室温下恢复3 d后，OE株系基本上恢复了正常生长，而WT株系几乎全部死亡（图4-A–B，D），与WT相比，OE株系的存活率显著增加（$P<0.05$）。随后，对不同拟南芥植株成苗期的抗冻性进行评估。将一批生长至21日龄不经过任何处理的成苗作为对照组，进行拍照。另一批成苗在4 ℃寒冷锻炼8 h，-5 ℃处理3 h进行冷冻胁迫，室温恢复3 d后拍照。冷冻胁迫后WT株系表现出更多的萎蔫、黄化，而OE株系则受胁迫程度较轻且长势良好（图4-C）。因此，推测*MsCZF29*过表达可以提高植株耐冻性。

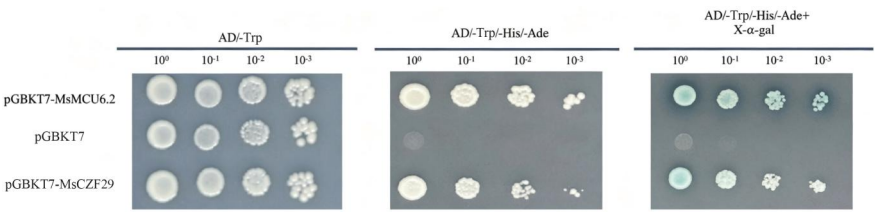
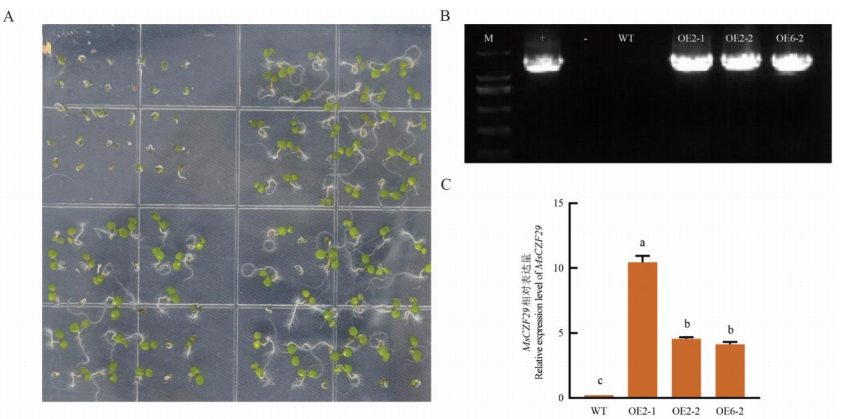


图2 pGBKT7-*MsCZF29*在转化Y2H酵母菌株中的活性验证

Fig. 2 Activity validation of pGBKT7-*MsCZF29* in transformed Y2H yeast strains

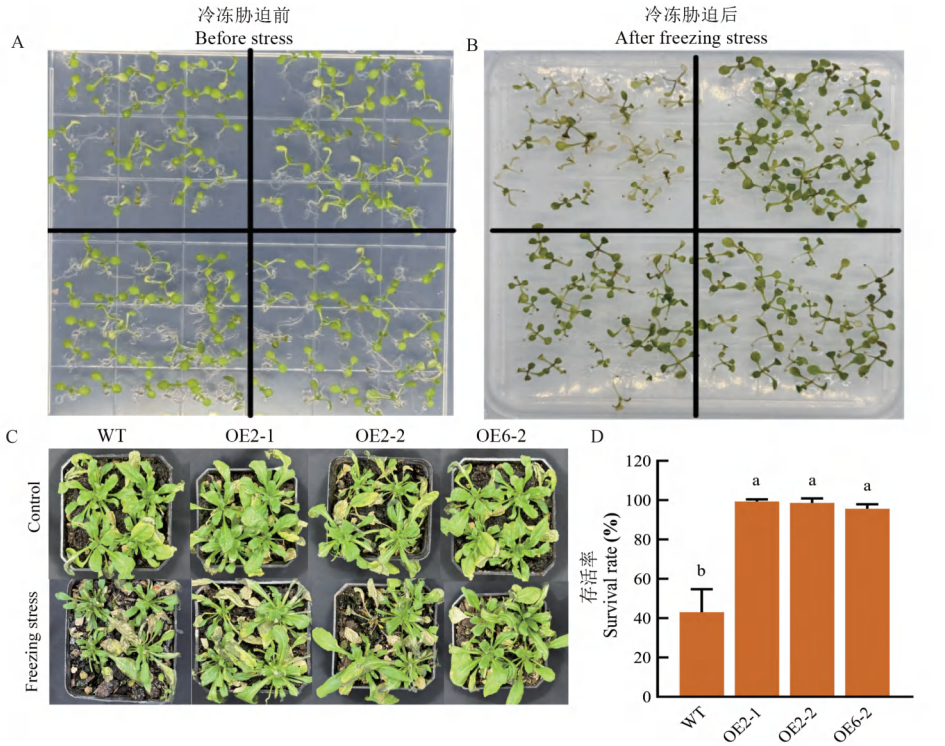


M：DL 2 000 DNA marker，+：质粒，−：ddH_2O，WT：野生型拟南芥，OE2-1、OE2-2、OE6-2：转基因拟南芥；A：T_1代拟南芥阳性苗培养基（含卡那霉素）筛选；B：T_3代拟南芥阳性苗分子鉴定；C：转基因拟南芥阳性植株中基因*MsCZF29*的相对表达量。误差线表示标准差，小写字母代表$P<0.05$水平下差异显著，下同

M: DL 2000 DNA marker, +: plasmid, −: ddH_2O, WT: wild-type *A. thaliana*, OE2-1, OE2-2, OE6-2: transgenic *A. thaliana*. A: Screening of T_1-generation *A. thaliana* positive seedlings (on kanamycin-containing medium). B: Molecular identification of T_3-generation *A. thaliana* positive seedlings. C: Relative expression level of the *MsCZF29* gene in transgenic *A. thaliana* positive plants. Error bars indicate the standard deviation. Lowercase letters indicate significant differences at the $P<0.05$ level, the same below

图3 转基因拟南芥阳性苗筛选与分子鉴定

Fig. 3 Screening and molecular identification of *A. thaliana* positive seedlings



A:未处理下野生型与转基因拟南芥幼苗的表型;B:冷冻处理下野生型与转基因拟南芥幼苗的表型;C:冷冻处理前后拟南芥盆栽表型变化;D:冷冻后野生型与转基因型拟南芥的存活率

A: Phenotypes of wild-type and transgenic *A. thaliana* seedlings under untreated conditions. B: Phenotypes of wild-type and transgenic *A. thaliana* seedlings under freezing treatment. C: Changes in the phenotypes of *A. thaliana* potted plants before and after freezing treatment. D: Survival rates of wild-type and transgenic *A. thaliana* after freezing

图4　野生型与转*MsCZF29*基因拟南芥在冷冻胁迫下的表型分析

Fig. 4　Phenotypic analysis of wild-type and *MsCZF29*-transgenic *A. thaliana* under freezing stress

2.6　*MsCZF29*对冷冻胁迫下拟南芥细胞膜透性的影响

植物中MDA含量和REL是反映植物细胞膜透性的重要指标。通过测定转基因植物中MDA含量发现，胁迫前OE组与对照组MDA无明显差异，但在冷冻胁迫后OE组的MDA显著降低（P<0.05）（图5-A）。此外，对冷冻胁迫后的REL测定结果显示，胁迫前OE组与对照组无明显差异，冷冻胁迫后，OE组REL显著低于对照组（P<0.05）（图5-B）。因此，冷冻胁迫后OE株系和WT株系的细胞膜均受到损伤，但OE株系受到的损伤明显小于WT株系，说明过表达*MsCZF29*可以在冷冻胁迫后通过调节植物中的渗透调节物质使其更快恢复到正常状态。

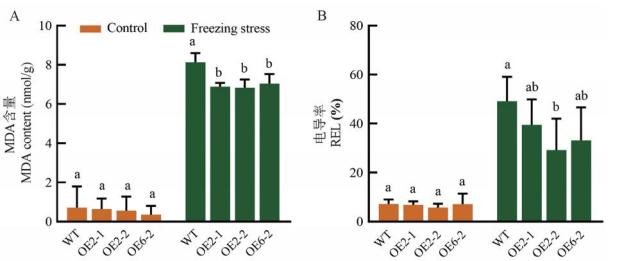


图5　野生型与转*MsCZF29*基因拟南芥在冷冻胁迫下的细胞膜透性分析

Fig. 5　Cell membrane permeability analysis of wild-type and *MsCZF29*-transgenic *A. thaliana* under freezing stress

2.7　*MsCZF29*对冷冻胁迫下拟南芥抗氧化酶活性的影响

为了鉴定*MsCZF29*基因对冷冻处理后植物抗氧化酶活性的影响，对OE2-1、OE2-2、OE6-2和WT测定其SOD、POD和CAT。结果显示（图6），未胁迫时，各株系间无明显差异。冷冻处理后，OE株系POD、SOD、CAT显著高于WT（P<0.05）。这些结

果显示，*MsCZF29*基因可以通过提高抗氧化酶活性、减轻膜损伤来增强拟南芥的耐冻性。

2.8 *MsCZF29*诱导拟南芥非生物胁迫相关基因的表达

AtCOR6.6、*AtCOR47*、*AtRD29A*、*AtPOD*和*AtCAT*是拟南芥响应低温的关键调控基因[27]。利用RT-qPCR技术分析其在*MsCZF29*转基因株系（OE2-1、OE2-2和OE6-2）中的表达量发现，在未受胁迫时，OE与WT株系中*AtPOD*、*AtCAT*、*AtCOR6.6*、*AtCOR47*和*AtRD29A*的表达水平差异较小，但是在冷胁迫处理后，过表达*MsCZF29*可以诱导这些基因表达量上调（图7），特别是*AtCOR47*基因的表达量达到WT的10倍左右（图7-C）。说明*MsCZF29*基因可以激活拟南芥低温响应基因进而提高拟南芥耐冻性。

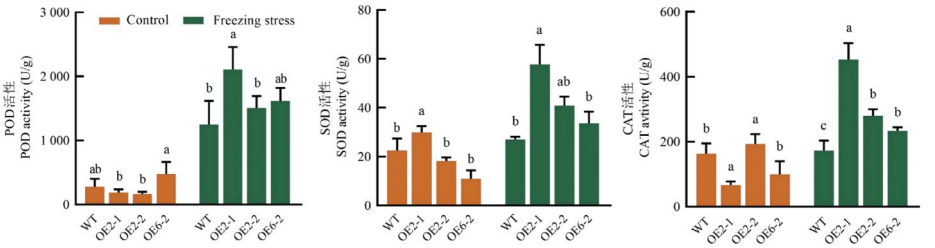


图6 野生型与转*MsCZF29*基因拟南芥在冷冻胁迫下的抗氧化酶活性分析

Fig. 6 Analysis of antioxidant enzyme activity in wild-type and *MsCZF29*-transgenic *A. thaliana* under freezing stress

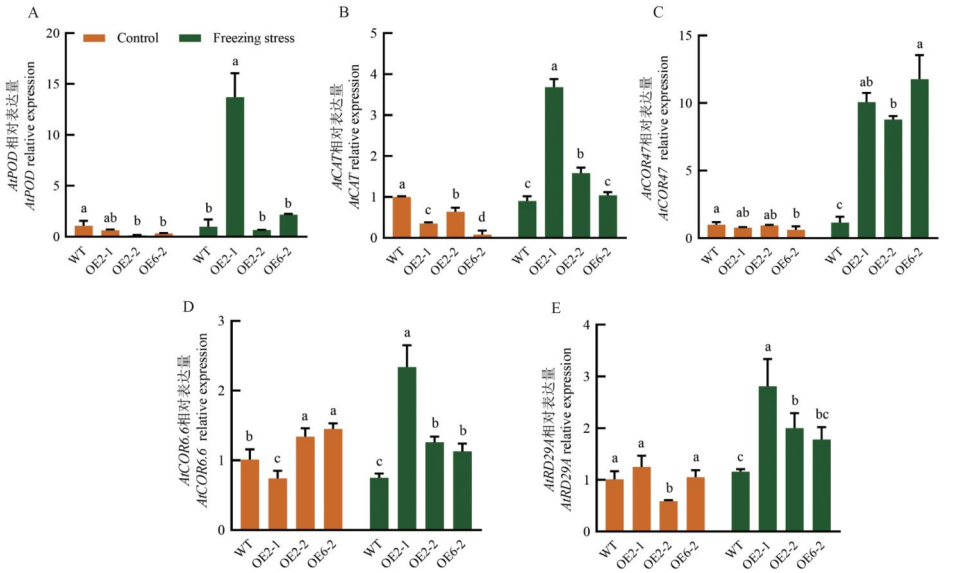


图7 拟南芥低温响应基因在*MsCZF29*转基因拟南芥中的表达量分析

Fig. 7 Expression analysis of the cold-responsive genes in *MsCZF29* overexpressing *A. thaliana*

3 讨论

锌指蛋白是植物中最广泛的超家族之一，主要是通过结合DNA特定序列控制基因的转录过程，从而影响基因的表达。虽然C3H型锌指蛋白在模式植物拟南芥中被鉴定，但在其他植物中该基因家族成员的抗逆功能研究较少。本研究从“东农1号”中克隆获得*MsCZF29*基因，Sun等[29]研究发现，C3H型锌指蛋白的*AtSZF1*和*AtSZF2*蛋白在结构特征上包含了2个串联的CCCH型锌指基序和N末端的两个锚蛋白重复结构域（ANK），在本研究中，对得到的目的基因进行生物信息学分析后发现，*MsCZF29*包含了2个ANK结构域和2个ZnF_C3H1结构域，与其发

现的结构特征相同。

转录因子作为调控基因表达的重要因子，进入细胞核中与靶基因的特定序列结合，才能充分发挥其核心功能，但并不是所有的转录因子一定会定位到细胞核中。有相关报道显示，植物的C3H型锌指蛋白可能会定位到不同的细胞器中，如水稻*OsC3H12*定位于细胞核[30]，而Xu等[31]发现油菜的*BcMF30a*和*BcMF30c*定位在细胞质中，除此之外，蜡梅*CpC3H3*定位于细胞膜上[32]。因此，本研究进行了亚细胞定位试验来确定*MsCZF29*在紫花苜蓿中行使功能的细胞器。研究结果发现，*MsCZF29-GFP*在细胞核中检测到荧光信号，证明*MsCZF29*可能调控下游靶基因的表达从而在紫花苜蓿应对低温胁迫中发挥重要作用。根据前人研究发现，水稻[33] *OsLIC*和拟南芥[34] *AtC3H14*和*AtC3H15*具有转录激活活性，它们的基因均包含C3H型锌指结构。为了验证MsCZF29的转录激活活性，本研究对MsCZF29进行了自激活活性检测。结果发现，MsCZF29在AD/-Trp/-His中可以正常生长，而阴性对照酵母无法生长，且在加了X-α-gal的培养基中变蓝，说明MsCZF29具有转录自激活活性，与上述前人研究结果一致。

在冷冻胁迫下，过多的ROS积累会导致细胞膜脂过氧化和损伤。MDA含量和REL是评价植物细胞膜损伤的重要指标[35]。在本研究中，*MsCZF29*过表达拟南芥株系和WT株系在室温下，REL和MDA含量无显著差异，在-5 ℃处理3 h后，过表达株系的REL和MDA含量显著低于WT株系。这与吴玥[36]将枳的*PtrTZF1*异源转入烟草中研究结果一致：转基因系的REL和MDA含量比WT少，活性氧清除能力强，证明了*PtrTZF1*可以提高作物的抗寒性。细胞内的抗氧化酶（如CAT、SOD和POD）可以缓解ROS对细胞膜造成的伤害。在本研究中，*MsCZF29*过表达株系在-5 ℃下，CAT、SOD和POD的活性显著高于WT。结果表明，在冷冻处理下，*MsCZF29*加强了拟南芥对细胞内ROS稳态平衡的调节。为了更直观地了解*MsCZF29*能否提高植物的抗寒性，对WT和过表达株系的幼苗期和成苗期的拟南芥进行了冷冻处理。在-5 ℃条件下冷冻3 h后，幼苗期的WT株系大部分萎蔫死亡，而过表达株系的存活率显著高于WT。成苗期的WT株系经过3 h冷冻胁迫之后，叶片明显枯萎黄化，而过表达株系室温恢复3 d后，叶片复绿，正常生长。这些结果表明*MsCZF29*的过表达可以增强拟南芥的抗氧化性，从而提高拟南芥的耐冻性。

*MsCZF29*编码的锌指结构域具有高度保守的DNA结合基序，可在低温初期直接调控下游氧化还原酶基因如CAT和POD的转录效率，从而及时缓解活性氧积累引发的细胞损伤。为了探究*MsCZF29*表达的调控机制，试验选取5个拟南芥响应低温的关键调控基因：*AtCOR6.6*、*AtCOR47*、*AtRD29A*、*AtPOD*和*AtCAT*进行RT-qPCR实验并分析其表达量，结果发现MsCZF29可以激活调控拟南芥低温响应基因进而提高拟南芥的耐冻性。相较于同家族成员如CZF1主要参与盐胁迫响应，*MsCZF29*在冷驯化早期的专一性激活填补了紫花苜蓿CZF亚家族在耐冻功能研究中的空白，通过优化基因工程靶点可提升品种的极端气候适应性。总之，RT-qPCR数据不仅验证了*MsCZF29*作为早期冷响应枢纽的调控地位，还深化了对紫花苜蓿耐冻分子网络的理解，为后续基因编辑与育种应用奠定理论基础。

4　结论

成功克隆了紫花苜蓿基因*MsCZF29*，该基因含有C3H结构域。MsCZF29蛋白定位于细胞核，且具有转录激活活性。在冷冻胁迫后，*MsCZF29*过表达拟南芥株系的存活率、抗氧化酶活性、抗逆基因表达水平等均显著提高，说明*MsCZF29*在耐寒调控过程中起正向调控作用，可以提高植物的耐冻性。

文章所有附图附表请点击链接查看（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260521162101_NewsFile_46.pdf）

参考文献

[1] 轩一芙, 韩子坤, 贠新龙, 等. 8个紫花苜蓿品种在黑龙江省大庆地区生产性能综合评价 [J]. 草原与草坪, 2025, 45(4): 179-187.
Xuan YF, Han ZK, Yun XL, et al. Comprehensive evaluation of production performance of eight alfalfa varieties in Daqing area, Heilongjiang Province [J]. Grassland Turf, 2025, 45(4): 179-187.

[2] 王园, 王晶, 李淑霞. 紫花苜蓿*MsBBX24*基因的克隆及耐盐性分析 [J]. 草业学报, 2023, 32(3): 107-117.
Wang Y, Wang J, Li SX. Cloning of *MsBBX24* from alfalfa

(*Medicago sativa*) and determination of its role in salt tolerance [J]. Acta Prataculturae Sin, 2023, 32(3): 107-117.

[3] 杨青川, 康俊梅, 张铁军, 等. 苜蓿种质资源的分布、育种与利用 [J]. 科学通报, 2016, 61(2): 261-270.
Yang QC, Kang JM, Zhang TJ, et al. Distribution, breeding and utilization of alfalfa germplasm resources [J]. Chin Sci Bull, 2016, 61(2): 261-270.

[4] 任卫波, 陈立波, 郭慧琴, 等. 紫花苜蓿耐寒越冬性研究进展 [J]. 中国草地学报, 2008, 30(2): 104-108.
Ren WB, Chen LB, Guo HQ, et al. Progress in winter hardiness and survival of alfalfa [J]. Chin J Grassland, 2008, 30(2): 104-108.

[5] Guo XY, Liu DF, Chong K. Cold signaling in plants: Insights into mechanisms and regulation [J]. J Integr Plant Biol, 2018, 60(9): 745-756.

[6] Ruelland E, Vaultier MN, Zachowski A, et al. Chapter 2 cold signalling and cold acclimation in plants [M]//Advances in Botanical Research. Amsterdam: Elsevier2009: 35-150.

[7] 杨梅. 紫花苜蓿*MsVDAC*基因克隆及抗寒耐旱功能分析 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2022.
Yang M. Isolation of *MsVDAC* from alfalfa (*Medicago sativa* L.) and cold tolerance and drought resistance analysis [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2022.

[8] Riechmann JL, Heard J, Martin G, et al. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes [J]. Science, 2000, 290(5499): 2105-2110.

[9] 赵欣羽, 张文颖, 张楚熠, 等. 艾基因组中*MYC*转录因子基因家族鉴定及表达分析 [J]. 中草药, 2025, 56(23): 8713-8722.
Zhao XY, Zhang WY, Zhang CY, et al. Genome-wide identification and expression analysis of *MYC* transcription factor gene family in *Artemisia argyi* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(23): 8713-8722.

[10] Laity JH, Lee BM, Wright PE. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity [J]. Curr Opin Struct Biol, 2001, 11(1): 39-46.

[11] Liu K, Hou QD, Yu RR, et al. Genome-wide analysis of C2H2 zinc finger family and their response to abiotic stresses in apple [J]. Gene, 2024, 904: 148164.

[12] Shuai Y, Feng GY, Yang ZF, et al. Genome-wide identification of C2H2-type zinc finger gene family members and their expression during abiotic stress responses in orchardgrass (*Dactylis glomerata*) [J]. Genome, 2022, 65(4): 189-203.

[13] Sun SJ, Guo SQ, Yang X, et al. Functional analysis of a novel Cys2/His2-type zinc finger protein involved in salt tolerance in rice [J]. J Exp Bot, 2010, 61(10): 2807-2818.

[14] Zhang H, Liu YP, Wen F, et al. A novel rice C2H2-type zinc finger protein, ZFP36, is a key player involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and oxidative stress tolerance in rice [J]. J Exp Bot, 2014, 65(20): 5795-5809.

[15] Joseph MP, Papdi C, Kozma-Bognár L, et al. The *Arabidopsis* zinc FINGER PROTEIN3 interferes with abscisic acid and light signaling in seed germination and plant development [J]. Plant Physiol, 2014, 165(3): 1203-1220.

[16] Zhang X, Guo XP, Lei CL, et al. Overexpression of SlCZFP1, a novel TFIIIA-type zinc finger protein from tomato, confers enhanced cold tolerance in transgenic *Arabidopsis* and rice [J]. Plant Mol Biol Rep, 2011, 29(1): 185-196.

[17] Han YC, Fu CC. Cold-inducible MaC2H2s are associated with cold stress response of banana fruit via regulating MaICE1 [J]. Plant Cell Rep, 2019, 38(5): 673-680.

[18] 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.

[19] Berg JM, Shi YG. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc [J]. Science, 1996, 271(5252): 1081-1085.

[20] Brown RS. Zinc finger proteins: getting a grip on RNA [J]. Curr Opin Struct Biol, 2005, 15(1): 94-98.

[21] Kim DH, Yamaguchi S, Lim S, et al. SOMNUS, a CCCH-type zinc finger protein in *Arabidopsis*, negatively regulates light-dependent seed germination downstream of PIL5 [J]. Plant Cell, 2008, 20(5): 1260-1277.

[22] Han GL, Qiao ZQ, Li YX, et al. The roles of CCCH zinc-finger proteins in plant abiotic stress tolerance [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 8327.

[23] Lin PC, Pomeranz MC, Jikumaru Y, et al. The *Arabidopsis* tandem zinc finger protein AtTZF1 affects ABA- and GA-mediated growth, stress and gene expression responses [J]. Plant J, 2011, 65(2): 253-268.

[24] Wang WY, Liu BH, Xu MY, et al. ABA-induced CCCH tandem zinc finger protein OsC3H47 decreases ABA sensitivity and promotes drought tolerance in *Oryza sativa* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 464(1): 33-37.

[25] Ren NP, Liu JL, Wang HB, et al. Combined transcriptomic and proteomic analysis reveals the response mechanisms of alfalfa to freezing stress [J]. Front Plant Sci, 2026, 16: 1682825.

[26] 孙群, 胡景江. 植物生理学研究技术 [M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2006.
Sun Q, Hu JJ. Research technology of plant physiology [M]. Yangling: Northwest A&F University Press, 2006.

[27] Li XG, Liang XQ, Li WH, et al. Isolation and functional analysis of *MbCBF2*, a *Malus baccata* (L.) borkh *CBF* transcription factor gene, with functions in tolerance to cold and salt stress in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 9827.

[28] Adnan M, Morton G, Hadi S. Analysis of rpoS and bolA gene

expression under various stress-induced environments in planktonic and biofilm phase using $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Mol Cell Biochem, 2011, 357(1/2): 275-282.

[29] Sun JQ, Jiang HL, Xu YX, et al. The CCCH-type zinc finger proteins AtSZF1 and AtSZF2 regulate salt stress responses in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Physiol, 2007, 48(8): 1148-1158.

[30] Bai HR, Lin P, Li X, et al. DgC3H1 a CCCH zinc finger protein gene, confers cold tolerance in transgenic *Chrysanthemum* [J]. Sci Hortic, 2021, 281: 109901.

[31] Xu LA, Xiong XP, Liu TT, et al. Heterologous expression of two *Brassica campestris* CCCH zinc-finger proteins in *Arabidopsis* induces cytoplasmic foci and causes pollen abortion [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(23): 16862.

[32] Liu HM, Xiao SQ, Sui SZ, et al. A tandem CCCH type zinc finger protein gene *CpC3H3* from *Chimonanthus praecox* promotes flowering and enhances drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. BMC Plant Biol, 2022, 22: 506.

[33] 王砺寒. 水稻蛋白激酶OsMAPK6通过OsLIC和OsCATA调控抗病的机制研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
Wang LH. Study on the mechanism of rice protein kinase OsMAPK6 regulating disease resistance through OsLIC and OsCATA [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022.

[34] Kim WC, Kim JY, Ko JH, et al. AtC3H14, a plant-specific tandem CCCH zinc-finger protein, binds to its target mRNAs in a sequence-specific manner and affects cell elongation in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 2014, 80(5): 772-784.

[35] 安飞飞, 李庚虎, 陈霆, 等. 植物耐寒生理及蛋白质组学研究进展 [J]. 中国农学通报, 2015, 31(14): 96-101.
An FF, Li GH, Chen T, et al. Research progress on physiology and proteomics for cold tolerance in plants [J]. Chin Agric Sci Bull, 2015, 31(14): 96-101.

[36] 吴玥. 枳锌指蛋白PtrTZF1抗寒功能鉴定及机制解析 [D]. 赣州: 赣南师范大学, 2023.
Wu Y. Functional characterization and mechanisms of cold stress tolerance conferred by a zinc finger protein PtrTZF1 in *Poncirus trifoliata* [D]. Ganzhou: Gannan Normal University, 2023.

（责任编辑　张婷婷）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):164-173

石仙桃中天麻素合成相关糖基转移酶基因的克隆与表达分析

刘保财[1,2] 胡学博[3] 赵云青[1,2] 黄颖桢[1,2] 张武君[1,2] 陈菁瑛[1,2*]
（1.福建省农业科学院作物研究所，福州 350003；2.福建省农业科学院药用植物研究中心，福州 350003；3.华中农业大学植物科技学院，武汉 430070）

摘 要：【目的】发掘石仙桃中天麻素生物合成最后关键步骤的糖基转移酶基因，为利用工程菌高效生产天麻素奠定基础。【方法】采用双酶切法，克隆候选基因*transcript28360/f2p0/1592*（*1592*）和*transcript17418/f3p0/2174*（*2174*），以*AsUGT*为阳性对照，在大肠杆菌和酵母中进行表达。【结果】基因*2174*由1 413个核苷酸组成，编码470个氨基酸，大小约为51.12 kD，主要位于叶绿体中。基因*1592*由1 395个核苷酸组成，编码464个氨基酸，大小约为50.85 kD，主要位于细胞质中。3个酶催化天麻苷元的活性中心均有亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、谷氨酸等残基，可能是催化天麻苷元形成天麻素的关键活性残基。在大肠杆菌和酵母中表达表明，基因*2174*具有较高的催化天麻苷元生成天麻素的活性，是对照基因*AsUGT*的2.31-3.39倍，而基因*1592*具有较弱的催化活性。【结论】石仙桃中糖基转移酶基因*2174*和*1592*催化天麻苷元生成天麻素过程中存在活性差异，基因*2174*可作为工程菌生产天麻素关键酶的候选基因。

关键词：石仙桃；天麻素；糖基转移酶；大肠杆菌；酵母
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1297

Cloning and Expression Analysis of Glycosyltransferase Genes Involved in Gastrodin Biosynthesis in *Pholidota chinensis* Lindl.

LIU Bao-cai[1,2] HU Xue-bo[3] ZHAO Yun-qing[1,2] HUANG Ying-zhen[1,2] ZHANG Wu-jun[1,2] CHEN Jing-ying[1,2*]
(1. *Institute of Crop Sciences, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou* 350003; 2. *Research Center for Medicinal Plant, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou* 350003; 3. *College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan* 430070)

Abstract: 【Objective】This study aimed to discover the glycosyltransferase gene involved in the final key step of gastrodin biosynthesis in *Pholidota chinensis*, providing a basis for the high-yield production of gastrodin using engineered microbial systems. 【Method】The candidate genes *transcript28360/f2p0/1592* (*1592*) and *transcript17418/f3p0/2174* (*2174*) were cloned by double restriction enzyme digestion. Using *AsUGT* as a positive control, the three genes were expressed in *Escherichia coli* and yeast. 【Result】Gene *2174* consists of 1 413 nucleotides, encoding 470 amino acids with a molecular weight of approximately 51.12 kD, and is primarily localized in the chloroplast. Gene *1592* consists of 1 395 nucleotides, encoding 464 amino acids with a molecular weight of approximately 50.85 kD, and is primarily localized in the cytoplasm. The active sites of all three enzymes catalyzing gastrodianin conversion contained residues such as leucine, phenylalanine, threonine, and glutamic acid, which may represent key active residues for the conversion of gastrodianin to gastrodin. Expression studies in *E. coli* and yeast revealed that gene *2174* exhibited higher catalytic activity in converting gastrodigenin to gastrodin, demonstrating 2.31 - to 3.39-fold higher activity than the control gene *AsUGT*. However, gene *1592* showed weaker catalytic activity. 【Conclusion】The glycosyltransferase genes *2174* and *1592* from *P. chinensis* exhibit differential catalytic activities in the conversion of gastrodigenin to gastrodin. Gene *2174* is a promising candidate for use as a key enzyme in the engineered production of gastrodin.

Keywords: *Pholidota chinensis*; gastrodin; glycosyltransferase; *Escherichia coli*; yeast

收稿日期：2025-11-28
基金项目：福建省属公益类项目（2020R1034003），福建省人民政府协同创新工程项目（XTCXGC2021003），福建省农业科学院科技创新团队（CXTD2021014-2），“一带一路”国家传统草药实物库及图片信息库建设（2018FY100702）
*通信作者：陈菁瑛 cjy6601@163.com

植物中的糖基转移酶（glycosyltransferase, GT）是一个庞大的基因家族[1]，对植物的生长发育具有重要作用，参与了植物的生长发育[2-3]、胁迫适应性[4-5]、次生代谢物的形成[6-7]等。天麻素是珍稀濒危药用植物天麻（*Gastrodia elata* Blume）[8]、石仙桃（*Pholidota chinensis* Lindl.）[9]等的主要活性成分之一，在天麻[10-11]及石仙桃中的生物合成通路均被解析。此外，通过对大肠杆菌[12]、酵母[13]等工程菌的设计，已经建立了从葡萄糖开始合成天麻素的通路和方法。然而，无论植物还是工程菌中，天麻素生物合成过程最后关键步骤均为天麻苷元经过GT催化，从而形成天麻素，但不同来源的GT在酵母中催化天麻苷元生成天麻素的效率截然不同[13]。因此，为了降低生产成本，提高转化效率，生产上迫切需要在同源基因中挖掘具有更高效催化活性的GT基因。

石仙桃系兰科（Orchidaceae）石仙桃属（*Pholidota*）珍稀濒危多年生长的附生草本植物，俗称石橄榄，主要用于治疗头痛、头晕等疾病，具有高含量的天麻素[14]，可作为发掘天麻素生物合成通路中关键酶的基因资源。课题组前期获得了石仙桃中可能参与天麻素生物合成的关键酶GT的候选基因，并筛选了内参基因对候选基因进行了初步的定量表达验证[15]，在石仙桃中*transcript28360/f2p0/1592*（*1592*）和*transcript17418/f3p0/2174*（*2174*）为最佳候选基因，并且与已验证具有催化天麻苷元转换为天麻素的*AsUGT*[13]为同源基因。然而，这两个基因尚未进行克隆和异源表达，是否具有催化天麻苷元转换为天麻素的活性以及活性强弱均未知。而且，在石仙桃中尚未有关于GT基因克隆的报道，制约着石仙桃的功能基因的充分利用，也阻碍了利用工程菌高效生产天麻素的进程。

基于此，本研究对*transcript28360/f2p0/1592*（*1592*）和*transcript17418/f3p0/2174*（*2174*）两个基因开展功能验证，发掘催化天麻苷元形成天麻素的高效GT基因，为石仙桃的GT基因的应用和利用工程菌高效生产天麻素奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

取驯化栽培的石仙桃幼嫩叶片，用清水冲洗干净，吸干表面的水分，用锡箔纸包裹，立即放入液氮中10 min，置于-80 ℃冰箱中保存，用于RNA提取。

1.2　方法

1.2.1　RNA提取与cDNA合成　参照多糖多酚植物总RNA提取试剂盒（杭州博日科技股份有限公司）说明书进行RNA提取，通过紫外分光光度仪（NanoDrop 1 000，Thermo，美国）和1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的质量、完整性及浓度。按照EX RT kit（gDNAremover，北京庄盟国际生物基因科技有限公司）第一链反转录试剂盒说明书进行cDNA逆转录操作。

1.2.2　目的基因克隆　根据候选基因序列利用Primer3Plus软件（https://www.primer3plus.com/）设计引物（表1）。以获得的cDNA为模板进行PCR扩增（超强高保真PCR试剂盒，天根生化科技（北京）有限公司），反应体系：100 ng模板DNA、1.25 μL Forward Primer（10 μmol/L）、1.25 μL Reverse Primer（10 μmol/L）、25 μL Mix（with dye），加ddH_2O至50 μL。经1%琼脂糖凝胶电泳对PCR产物验证，用胶回收试剂盒回收和纯化目的条带。同时合成报道的*AsUGT*[13]基因全序列，作为阳性对照。

1.2.3　大肠杆菌表达载体构建及表达　将目的基因序列经密码子优化，按照表1中无缝克隆引物PCR，将获得的克隆片段插入到表达载体pET30a的His标签和*Hin*d III酶切位点之间，连接体系：5 μL PCR产物、5 μL线性化载体、10 μL Mix。含有目的基因的质粒转入到BL21(DE3)表达菌株中，划线到LB平板上（含50 μg/mL的氨苄青霉素），挑选单克隆，PCR验证，阳性克隆菌液提取质粒并酶切验证及测序。

验证的菌株接种至TB培养基（含50 μg/mL的氨苄青霉素），待培养OD_{600}为0.6–0.8，向试管培养液中加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（isopropyl β-D-thiogalactoside, IPTG）至终浓度0.2 mmol/L，之后分别置于15 ℃、37 ℃的摇床上，195 r/min培养16 h；培养液12 000 r/min离心5 min，最后加入SDS-PAGE缓冲液于100 ℃下加热样品30 min，离心后取上清电泳。

包涵体采用50 mmol/L Tris（pH 8.0）、150 mmol/L NaCl、1% Triton X-100、5 mmol/L EDTA，2 mmol/L DTT洗涤后，加入含50 mmol/L Tris（pH 8.0）、150 mmol/L NaCl、8 mol/L Urea、20 mmol/L Imidazole缓冲液，收集每个洗脱组分SDS-PAGE检测。

经Ni-IDA亲和层析，将样品加入到处理后的透

表1 基因克隆PCR引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR for gene clone

引物名称 Primer name	序列 Sequence(5′-3′)	用途 Purpose
2174-*Spe*I-F	GGACTAGTATGGAAATCGCTGGAT	Gene clone
2174-*Bgl*II-R	GAAGATCTCTAAAGTGCTACGCTCTT	
1592-*Spe*I-F	GGACTAGTATGGCTGATGGCAACCCA	
1592-*Bgl*II-R	GAAGATCTTCACTTAGTAGCCGTTGAATCCTT	
2174-F	GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCACCATCATCATCATCATATGGAAATCGCCG	Seamless gene clone
2174-R	GGTGGTGGTGCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTTACAGTGCCACACTTTTCCACTTAT	
1592-F	GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCACCATCATCATCATCATATGGCTGATGGTAATCC	
1592-R	GGTGGTGGTGCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTTATTTGGTTGCGGTGCTATCTTTCAGA	
AsUGT-F	GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCACCATCATCATCATCATATGGAACATACCCCG	
AsUGT-R	GGTGGTGGTGCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTTAGGTACTACTAATCTTATTTTCCCA	

析袋中，4 ℃环境下，透析到缓冲液1×PBS中复性6–8 h。上清用0.22 μm滤器过滤，冻存至-80 ℃。采用Bradford蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。

1.2.4 重组酶活性测定 将分离纯化后的酶配制为100 μL酶反应体系：20 μg酶、2 mmol/L天麻苷元和2 mmol/L UDP-Glc，用PB缓冲液定容至100 μL，混合均匀后置于35 ℃下过夜（12 h），用等体积乙醇终止反应[12]。反应液经0.22 μm有机滤膜过滤，使用HPLC检测天麻素和天麻苷元含量。

色谱条件：Eclipse Plus C18（4.6 mm×250 mm，3.5 μm，Agilent，柱温：30 ℃；流速：1 mL/min；进样量：10 μL；流动相A：0.05%磷酸水；流动相B：乙腈；检测波长为224 nm。

1.2.5 酵母中表达载体构建 利用*Spe* I和*Bgl* II限制性内切酶对带有氨苄和Ura标签的表达载体pESC370（由中国科学院天津工业生物技术研究所殷华老师提供）进行线性化。对目的基因以及合成基因*AsUGT*双酶切，反应体系50 μL：1 μL *Spe* I、1 μL *Bgl* II、2 000 ng pESC370、1 000 ng目的基因、10×Fast Digest buffer，加ddH_2O到50 μL，37 ℃孵育2 h[16]。利用T4连接酶将pESC370与目的基因连接，构建酵母表达载体，连接体系20 μL：100 ng线性载体、插入片段（与载体摩尔比5∶1）、2 μL 10×T4 Ligase Buffer、1 μL T4 DNA Ligase，加ddH_2O到20 μL，22 ℃水浴连接3 h，65 ℃热失活10 min。将重组后的产物转入DH5α感受态细胞（北京索莱宝科技有限公司），涂板，避光37 ℃过夜培养挑取单克隆，37 ℃ 200 r/min振荡培养3–4 h后进行菌液验证，将具有单一、明亮目的条带的菌液送至福州尚亚测序部进行测序。验证正确的菌液扩大培养，提取质粒并对该质粒进行双酶切验证。双酶切验证与序列比对结果均正确的重组质粒即为pESC370-AsUGT-Ura、pESC370-2174-Ura和pESC370-1592-Ura。

1.2.6 酵母表达及HPLC测定 将空载质粒pESC370和重组质粒分别转化至酵母BY4742（上海昂羽生物技术有限公司）中，涂板于SC/-Ura固体培养基上，30 ℃、避光培养2–3 d，挑取菌落，接菌于3 mL的SC/-Ura（20 g/mL葡萄糖）液体培养基，30 ℃、220 r/min振荡培养24 h后菌液验证。每隔一段时间对菌液的OD_{600}进行测定，当菌液的OD_{600}为2.0时，取1 mL菌液转入20 mL的SC/-Ura（20 g/mL葡萄糖和2 mmol/L天麻苷元），30 ℃ 220 r/min振荡培养，并于0、16、24、40、48 h取样1 mL离心，取上清液，用0.45 μm的聚醚砜滤膜过滤。进行HPLC检测，色谱条件同1.2.4，3次重复。

1.2.7 候选基因表达蛋白的理化特性及二级结构特征 通过MEME（https://meme-suite.org/meme/index.html）进行Motif分析，设置识别Motif数为5[17]；用ExPASy-ProtParam（https://web.expasy.org/protparam/）预测分析各基因氨基酸的理化性质[18]；用SignalP 6.0（https://services.healthtech.dtu.dk/service.php SignalP-6.0）以及DeepTMHMM（https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM）对蛋白的信号肽和跨膜结构进行预测；使用SOPMA（https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl）分析蛋白的二级结构，WoLF PSORT（https://www.genscript.com/wolf-psort.html）预测亚细胞位置[16]。

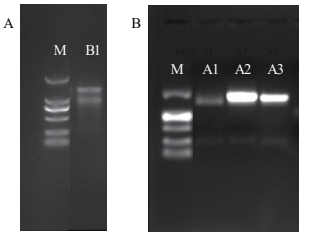
1.2.8　候选基因蛋白的三级结构特征及小分子对接　将获得的候选基因的氨基酸序列，通过SWISS-MODEL（https://swissmodel.expasy.org/）同源序列比对建模预测各个基因所编码蛋白的三级结构。从Pubchem（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）下载天麻苷元的SDF格式文件，用于后续对接分析。用AutoDockTools-1.5.7（https://ccsb.scripps.edu/mgltools/downloads）和Autodock-Vina-1.2.3（https://vina.scripps.edu/downloads/）[19]开展受体与配体的预处理、对接和可视化对接结果分析。

2　结果

2.1　RNA提取及基因克隆

从石仙桃叶片中提取的RNA经1%琼脂糖凝胶电泳和微量分光光度计检测其完整性和纯度，可以看到两条清晰的条带（图1-A），拖尾及降解不明显，A_{260}/A_{280}为1.92–2.08，即获得的RNA符合下一步实验要求。

经反转录完成cDNA的合成，PCR扩增后，再次进行凝胶电泳（图1-B），可见明显的目的基因条带，对目的条带进行切割及回收，获得新克隆的*2174*和*1592*基因，以及合成的*AsUGT*基因，共3个基因。



A：RNA凝胶电泳；B：克隆基因的凝胶电泳。M：DL2 000™ DNA marker；A1：基因*1592*；A2：基因*AsUGT*；A3：基因*2174*

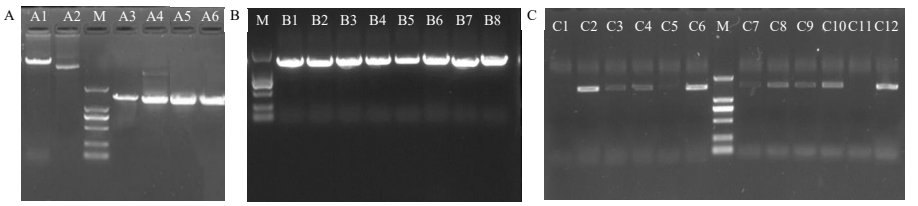
A: Gel electrophoresis of RNA. B: Gel electrophoresis of cloned genes. M: DL2 000™ DNA marker; A1: gene *1592*; A2: gene *AsUGT*; A3: gene *2174*

图1　石仙桃中RNA和克隆基因的凝胶电泳

Fig. 1　Gel electrophoresis of RNA and cloned genes in *P. chinensis*

2.2　质粒构建

将获得的目的基因和载体进行酶切（图2-A），连接后转入DH5α感受态细胞，挑选单克隆，菌液培养并进行PCR初步验证（图2-B–C）。进一步挑选具有明亮条带的菌落进行测序，获得序列准确与完整的质粒。提取质粒并转入酵母，作为喂养实验材料备用。



A：*1592*和*2174*双酶切（A1：线性化pESC370；A2：未线性化pESC370；A3：未酶切*1592*；A4：已酶切*1592*；A5：已酶切*2174*；A6：未酶切*2174*）。B：pESC370-*1592*-Ura大肠杆菌菌液验证（B1–B8：pESC370-*1592*-Ura单克隆）。C：pESC370-*AsUGT*-Ura和pESC370-*2174*-Ura大肠杆菌菌液验证（C1–C6：pESC370-*AsUGT*-Ura单克隆；C7–C12：pESC370-*2174*-Ura单克隆）。M：DL2 000™ DNA marker

A: Double enzyme digestion of *1592* and *2174* (A1: linearized pESC370; A2: unlinearized pESC370; A3: unenzymatically digested *1592*; A4: enzymatically digested *1592*; A5: enzymatically digested *2174*; A6: unenzymatically digested *2174*). B: The pESC370-*1592*-Ura validation in *E. coli* bacterial fluid (B1–B8: The pESC370-*1592*-Ura monoclonal). C: pESC370-*AsUGT*-Ura and pESC370-*2174*-Ura validation in *E. coli* bacterial suspension (C1–C6: pESC370-*AsUGT*-Ura monoclonal; C7–C12: pESC370-*2174*-Ura monoclonal). M: DL2 000™ DNA marker

图2　pESC370与目的基因的双酶切及菌液验证

Fig. 2　Dual enzyme digestion of pESC370 with target gene and bacterial culture validation

将获得的基因序列进行密码子优化后通过无缝克隆插入到表达载体pET30a中His标签和*Hin*d Ⅲ位点之间，测序正确的质粒经*Mlu* Ⅰ-*Xho* Ⅰ酶切后电泳，分别获得的条带约2 283/4 404（*2174*）、2 265/4 404（*1592*）和2 486/4 201（*AsUGT*），与预期大小一致（图3），然后转入BL21菌株中进行下一步的表达实验。

2.3　3个基因的序列及编码蛋白的理化特征

为了阐明这3个基因的催化活性差异，首先对3个基因的序列进行了氨基酸序列比对（图4），基

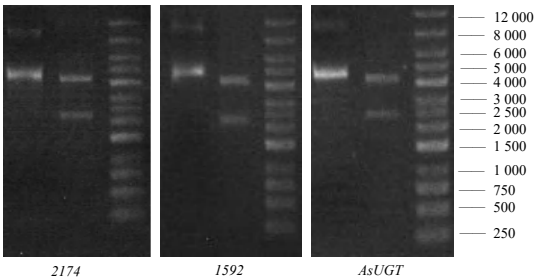


图3 表达载体pET30a酶切验证

Fig. 3 Enzymatic validation of expression vector pET30a

因*1592*由1 395个核苷酸组成，而*2174*和*AsUGT*虽然均由1 413个核苷酸组成，但序列不一致，且氨基酸序列也不同。进一步对3个基因的保守结构域分析（图5），3个基因具有5个保守的结构域，但结构域在基因上所处位置具有差异，*2174*与*AsUGT*的5个保守的结构域更加相似。

进一步对3个基因的理化特性分析（表2），基因*2174*有470个氨基酸，相对分子质量约为51.12 kD，亲水性平均系数为0.094，具有42.13%的α螺旋和6.17%的β转角，亚细胞定位主要位于叶绿体上。基因*AsUGT*同样具有470个氨基酸，相对分子质量约为51.80 kD，亲水性平均系数为-0.042，具有43.83%的α螺旋和7.23%的β转角，但其亚细胞定位主要位于细胞质中。基因*1592*则编码464个氨基酸，相对分子质量约为50.85 kD，亲水性平均系数为0.028，具有42.03%的α螺旋和6.68%的β转角，亚细胞定位也主要位于细胞质中。此外，这3个基因中均未发现信号肽及跨膜结构域的特征。

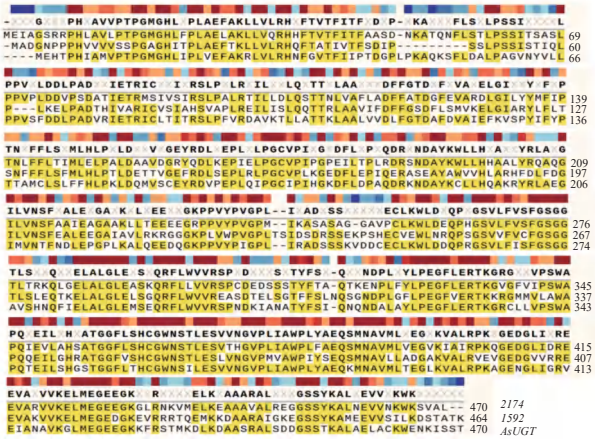


图4 三个基因的氨基酸序列比较

Fig. 4 Comparison of amino acid sequences of three genes

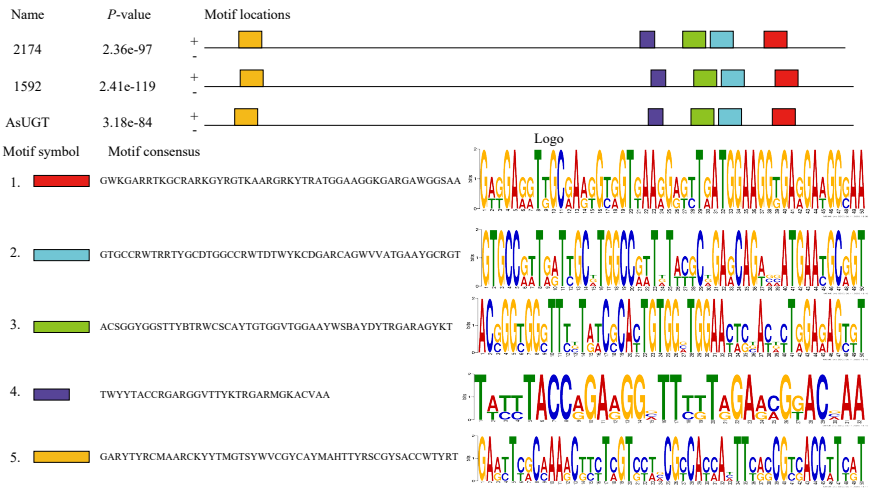


图5 三个基因的保守结构域

Fig. 5 Conserved motifs of three genes

2.4 3个基因编码蛋白的空间特征

为了明确目的基因所编码蛋白的空间结构，通过与*NtUGT1*（8chd.1.A）同源比对建模，基因*2174*、*1592*、*AsUGT*与*NtUGT1*糖基转移酶的一致性分别为53.75%（*2174*）、47.05%（*1592*）和71.24%（*AsUGT*），GMQE（global model quality estimate）分

表2　三个基因的理化特性

Table 2　Physicochemical properties of three genes

基因 Gene	氨基酸数 Amino acid quantity (aa)	相对分子质量 Relative molecular weight (kD)	等电点 PI	不稳定指数 Instability index	脂肪族氨基酸指数 Aliphatic index	亲水性平均系数 GRAVY	α螺旋 Alpha-helix (%)	延长链 Extended strand (%)	β转角 Beta-turn (%)	无规则卷曲 Random coil (%)	亚细胞定位 Subcellular localization
2174	470	51.12	5.42	48.4	99.85	0.094	42.13	14.47	6.17	37.23	chlo: 6, mito: 2, extr: 2, E.R.: 2, nucl: 1
AsUGT	470	51.80	5.87	44.84	94.64	-0.042	43.83	14.04	7.23	34.89	cyto: 7, chlo: 4, plas: 2
1592	464	50.85	5.43	42.25	95.56	0.028	42.03	14.44	6.68	36.85	cyto: 8, chlo: 3, nucl: 2

注：chlo：叶绿体；nucl：细胞核；mito：线粒体；extr：胞外；cyto：细胞质；plas：质膜；E.R.：内质网

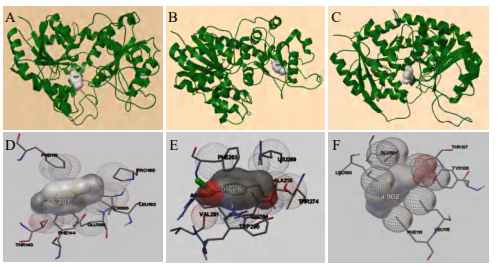
Note: chlo: Chloroplast; nucl: nucleus; mito: mitochondrion; extr: extracellular; cyto: cytoplasm; plas: plasma membrane; E.R.: endoplasmic reticulum

别为0.86、0.83和0.91，即该模型能较好预测这3个基因的空间结构，从而获得3个基因的三级结构。

将3个基因编码蛋白去除水分子和加氢后，分子对接结果表明（图6），3个蛋白与天麻苷元形成的结合能、活性中心存在差异。基因*2174*与天麻苷元形成的离子结合能为-5.201 kcal/mol，未形成氢键及共价键等，其活性中心位于119（PHE）、140（THR）、144（PHE）、183（LEU）、185（PRO）、385（ALA）、386（GLU）等氨基酸残基上。基因*1592*与天麻苷元形成的离子结合能为-5.726 kcal/mol，与263位上的PHE形成氢键，其活性中心位于263（PHE）、269（LEU）、265（ALA）、274（THR）、290（TRP）、291（VAL）、293（ARG）、294（GLU）等氨基酸残基上。基因*AsUGT*与天麻苷元形成的离子结合能为-4.902 kcal/mol，无氢键和共价键形成，其活性中心位于115（LEU）、116（PHE）、135、137（THR）、180（LEU）、384（GLU）等氨基酸残基上。亮氨酸（LEU）、苯丙氨酸（PHE）、苏氨酸（THR）、谷氨酸（GLU）残基参与了3个酶的活性中心，可能是催化天麻苷元形成天麻素的关键活性残基。

2.5　大肠杆菌中表达分析

将阳性的大肠杆菌BL21经诱导培养后，用10% SDS-PAGE分别检测3个基因表达蛋白，结果表明（图7），3个基因的表达产物在SDS-PAGE胶50 kD左右出现明亮的条带，而对照和诱导上清液中则没有条带，并且37 ℃条件下诱导的条带较15 ℃诱导



A和D：*2174*；B和E：*1592*；C和F：*AsUGT*

A and D: Gene *2174*; B and E: gene *1592*; C and F: gene *AsUGT*

图6　预测的3个基因的空间结构和与天麻苷元对接的活性中心

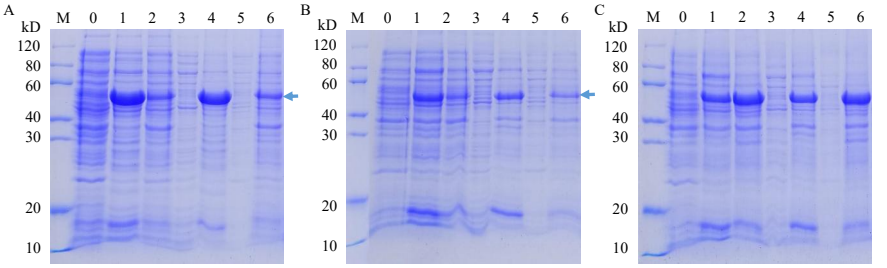
Fig. 6　Predicted spatial structure of the three genes and active centers docked to gastrodigenin

的条带弱，该结果与上述预测的3个基因蛋白的分子量大小基本一致，主要为非水溶性蛋白。

经进一步扩大培养以及Ni-IDA柱分离纯化，获得的纯化蛋白经SDS-PAGE分析，结果表明（图8），3个基因所表达的蛋白均约为50 kD。

2.6　重组蛋白的活性检测

三个表达蛋白经SDS-PAGE电泳纯度检测（图9），均有一个明亮的条带。孵育培养后，经HPLC测定结果表明（图10），与沸水浴加热过的蛋白对照相比，在5.4 min左右出现天麻素的峰，在7 min左右出现天麻苷元的峰。与报道的*AsUGT*基因相比（图11），基因*1592*重组表达蛋白的活性很低，而*2174*重组蛋白具有高度催化天麻苷元生成天麻素的活性，约为*AsUGT*的2.48倍。

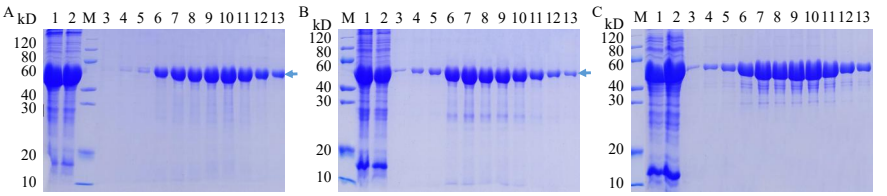


A:*AsUGT*;B:*1592*;C:*2174*。M:SDS-PAGE Protein marker;0:对照;1:15 ℃诱导16 h;2:37 ℃诱导16 h;3:15 ℃诱导上清;4:15 ℃诱导沉淀;5:37 ℃诱导上清;6:37 ℃诱导沉淀

A: *AsUGT*; B: *1592*; C: *2174*. M: SDS-PAGE Protein marker; 0: control; 1: induced at 15 ℃ for 16 h; 2: induced at 37 ℃ for 16 h; 3: induced at 15 ℃ for supernatants; 4: induced at 15 ℃ for precipitations; 5: induced at 37 ℃ for supernatants; 6: induced at 37 ℃ for precipitations

图7 三个基因诱导表达产物的SDS-PAGE分析

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of three genes induced expression products

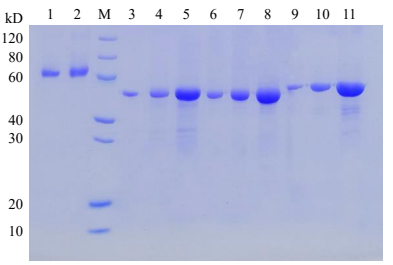


A:*AsUGT*;B:*1592*;C:*2174*。M:SDS-PAGE Protein marker;1:包涵体溶解后离心上清;2:上清同Ni-IDA孵育流出液;3-5:50 mmol/L咪唑的洗脱组分;6-8:100 mmol/L咪唑的洗脱组分;9-13:500 mmol/L咪唑的洗脱组分

A: *AsUGT*; B: *1592*; C: *2174*. M: SDS-PAGE Protein marker; 1: centrifugation supernatant after inclusion body lysis; 2: supernatant with Ni-IDA incubation effluent; 3-5: elution fractions of 50 mmol/L imidazole; 6-8: elution fractions of 100 mmol/L imidazole; 9-13: elution fractions of 500 mmol/L imidazole

图8 三个基因的表达蛋白分离后SDS-PAGE分析

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of three genes isolated target proteins



M:SDS-PAGE marker;1:BSA 1.0 μg;2:BSA 2.0 μg;3:蛋白2174 1.0 μg;4:蛋白2174 2.0 μg;5:蛋白2174 3.0 μg;6:蛋白1592 1.0 μg;7:蛋白1592 2.0 μg;8:蛋白1592 3.0 μg;9:蛋白AsUGT 1.0 μg;10:蛋白AsUGT 2.0 μg;11:蛋白AsUGT 3.0 μg

M: SDS-PAGE marker; 1: BSA 1.0 μg; 2: BSA 2.0 μg; 3: 2174 protein 1.0 μg; 4: 2174 protein 2.0 μg; 5: 2174 protein 3.0 μg; 6: 1592 protein 1.0 μg; 7: 1592 protein 2.0 μg; 8: 1592 protein 3.0 μg; 9: AsUGT protein 1.0 μg; 10: AsUGT protein 2.0 μg; 11: AsUGT protein 3.0 μg

图9 三个重组目标蛋白纯化后SDS-PAGE分析

Fig. 9 SDS-PAGE analysis of three purified recombinant target proteins

2.7 酵母中表达及底物喂养

为了确定3个基因在酵母中的活性，在等量菌液和浓度的液体培养基中添加等量的天麻苷元，结果表明（图12），与报道的*AsUGT*基因相比，基因*1592*在酵母中催化天麻苷元生成天麻素的活性很低。而来自石仙桃的基因*2174*则在酵母中具有高度催化天麻苷元生成天麻素的活性，同一反应时间（16、24、40、48 h）内，基因*2174*所催化产生的天麻素含量是基因*AsUGT*的3.39、2.86、2.39、2.31倍，在16 h时，差异倍数最大，随着反应底物的减少，其差异倍数逐渐变小。酵母菌液加入天麻苷元底物后的0-40 h内，基因*2174*的回归直线方程为y=0.115 9x-0.100 9，*AsUGT*的回归直线方程为y=0.048 7x-0.051 7，而0-48 h内基因*2174*和*AsUGT*的回归直线方程则分别为y=0.096 5x-0.062 2和y=0.043 3x-0.040 9，由此可见，回归直线

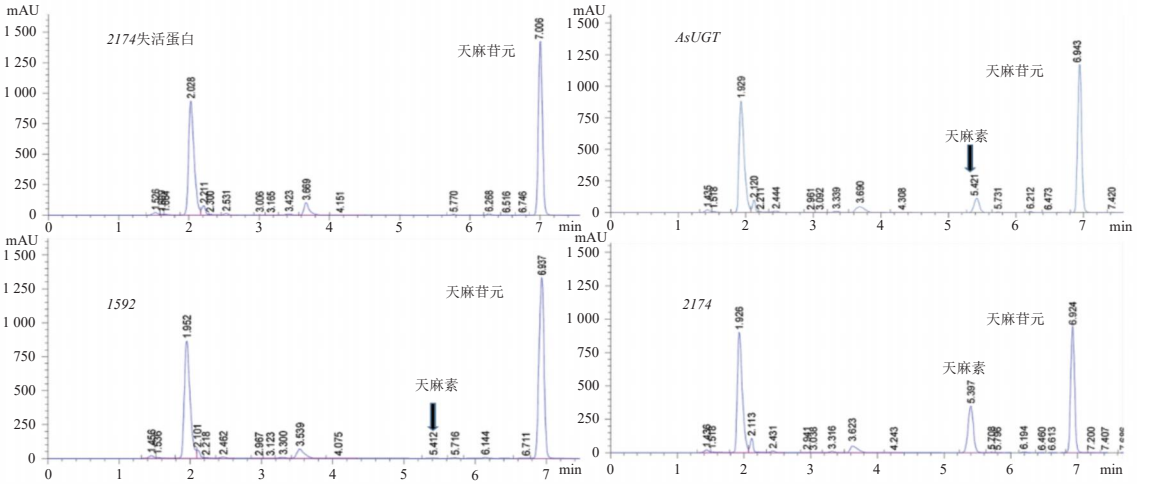


图10　重组蛋白催化天麻苷元生成天麻素峰图

Fig. 10　Peak diagram of recombinant protein catalyzing the GAS generation from HBA

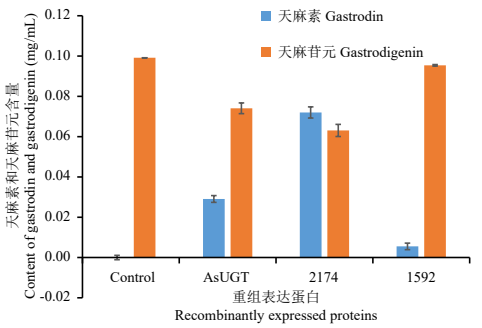


图11　重组蛋白的催化活性

Fig. 11　Catalytic activity of recombinant protein

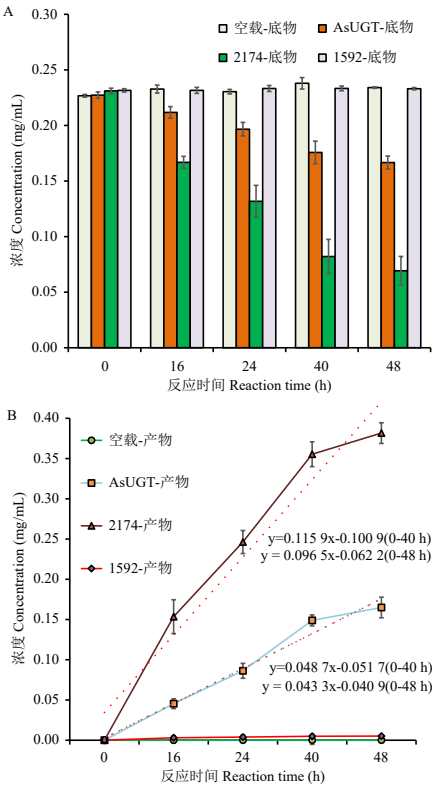
方程的斜率随着反应时间的延长逐渐变小，即在0–40 h内，具有高度的催化活性，40 h后，随着底物浓度的降低，转化生产天麻素的量也开始降低。

3　讨论

天麻素具有保护中枢神经系统、影响神经元生成等作用，临床上对偏头痛、抑郁症、中风和健忘症等疾病具有治疗效果[20–21]。在植物和工程菌中的天麻素生物合成过程，均是由天麻苷元经GT催化形成[10, 12]，但不同植物来源的GT催化天麻苷元的效率显著不同[13, 22]。本研究从珍稀濒危的石仙桃中克隆了2个GT候选基因，并与已验证功能的*AsUGT*[13]比较，经在大肠杆菌和酵母中异源表达，基因*2174*具有强烈的催化活性，较对照基因*AsUGT*，活性提高了2.31–3.39倍，相反，基因*1592*仅有微弱的催化活性，确定了2个基因催化天麻苷元生成天麻素的功能及活性差异，为利用工程菌高效生产天麻素奠定了基础。

为了明确基因的理化特征，对这3个基因的理化特性进行分析，基因*1592*与*AsUGT*都定位于细胞质中，但是氨基酸数量不同；而基因*2174*与*AsUGT*的氨基酸数量一致，但亚细胞定位不同，前者定位于叶绿体中。而从白及（*Bletilla striata*）中克隆及表达验证的糖基转移酶基因长度为1 419 bp，编码蛋白含472个氨基酸，该基因体外酶活验证具有催化天麻苷元生成天麻素的活性[23]，与本文克隆的基因*2174*仅有2个氨基酸的差异。本文中克隆的2个基因的大小约为50 kD，而从蛇根木（*Rauvolfia serpentina*）中分离获得的糖基转移酶的大小约为77.7 kD[24]，该酶在离体状态下具有高度催化天麻素合成的活性；在番茄（*Solanum lycopersicum*）中过表达、纯化耐碱的UDP-糖基转移酶，该酶可用于天麻素的生物合成，相对分子质量约为78.5 kD[25]，也大于本文所克隆到的2个基因；此外，两者均对酶的催化条件进行了优化和筛选，而本文中尚未对所表达酶的催化条件进行筛选，经对*2174*催化条件优化，可能会进一步提高其催化活性。

活性中心的氨基酸残基是酶与底物连接的关键位置，亮氨酸（LEU）、苯丙氨酸（PHE）、苏氨酸



A:底物;B:产物,红色的虚线是0–48 h之间,基因*2174*和*AsUGT*催化天麻苷元生成天麻素的回归直线,方程是以0–40 h和0–48 h所产生天麻素含量分别做的回归方程

A: Substrate; B: product. The red dashed line indicates the regression line of gastrodin generation from gastrodigenin catalyzed by gene *2174* and *AsUGT* in 0–48 h. The equations were regression equations based on the gastrodin content produced from 0 to 40 h and 0 to 48 h, respectively

图12 酵母菌液加入底物后催化活性差异

Fig. 12 Differences in catalytic activity after adding substrates to yeast solutions

(THR)、谷氨酸(GLU)残基参与了3个酶的活性中心,可能是催化天麻苷元形成天麻素的关键活性残基。活性中心的改变,可以提高酶的催化效率,在大肠杆菌中利用单突变技术提升了GT酶的催化效率,达到突变前的5倍[26]。多重突变也可以有效提高酶的活性,将来自拟南芥的GT基因,经三重突变后,突变体的酶催化活性比野生型高50.1%[27]。然而本研究中,基因*2174*在野生状态下已有较强的催化活性,未来将进一步研究其能否通过突变增强催化活性。此外,本研究仅克隆和验证了石仙桃的2个基因,未对其他同源基因的催化活性开展功能验证。在未来的验证研究中,可以优先考虑与基因*2174*相似度更高的同源基因,为石仙桃中GT基因资源的开发和应用提供了研究方向。

综上,本文克隆了石仙桃中的2个糖基转移酶基因,明确了这2个基因理化特征及催化天麻苷元形成天麻素的活性差异,为石仙桃中GT基因的开发利用及利用工程菌合成天麻素奠定了基础。

4 结论

从石仙桃克隆了2个糖基转移酶基因并合成*AsUGT*基因,基因*1592*和*2174*分别位于细胞质和叶绿体中,大小约为50 kD。3个酶催化天麻苷元的活性中心均有亮氨酸(LEU)、苯丙氨酸(PHE)、苏氨酸(THR)、谷氨酸(GLU)等残基。在大肠杆菌和酵母中,基因*2174*具有高度的催化天麻苷元生成天麻素的活性,显著高于对照*AsUGT*,而基因*1592*则仅有微弱的活性。本研究确定的基因*2174*可作为制备天麻素工程菌的候选基因。

参考文献

[1] Liu YQ, Wang Q, Liu XN, et al. pUGTdb: a comprehensive database of plant UDP-dependent glycosyltransferases [J]. Mol Plant, 2023, 16(4): 643-646.

[2] Kumar A, Tun TT, Kumar V. Genome-wide identification and expression analysis of UDP-glycosyltransferases genes associated with secondary metabolism during grain development in pearl millet (*Pennisetum* glaucum) [J]. Plant Gene, 2025, 44: 100541.

[3] Zhang CX, Ran ML, Liu DK, et al. A novel glycosyltransferase gene RsUGT71B5 from *Raphanus sativus* L. regulated root growth and seedling development [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 220: 109473.

[4] Hussain S, Verma B, Devi R, et al. Stress responsive glycosyltransferase (UGT72Z7) from *Glycyrrhiza glabra* showed glycosylation of azadirachtin [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2025, 197(12): 7800-7820.

[5] Ma YQ, Dong GR, Zhao SM, et al. *Arabidopsis* glycosyltransferase UGT86A1 promotes plant adaptation to salt and drought stresses [J]. Physiol Plant, 2025, 177: e70050.

[6] Wu QX, Chen YY, Ye MX, et al. A new UDP-glycosyltransferase for rare ginsenoside biosynthesis from *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) [J]. Carbohydr Res, 2025, 558: 109703.

[7] Shah S, Rastogi S, Akhtar MQ, et al. Mining and functional characterization of a flavonoid glucosyltransferase (*OtUGT*) involved in 7-*O*-glucosylation of apigenin in *Ocimum tenuiflorum* [J]. Plant

J, 2025, 121(6): e70111.

[8] Zhou RJ, Wang YL, Cao X, et al. Gastrodin from the *Gastrodia elata* Blume alleviates neuronal inflammation and injury via regulates NOX2/Nrf2 balance [J]. Neuropharmacology, 2025, 279: 110620.

[9] Liu BC, Chen JY, Zhang WJ, et al. The gastrodin biosynthetic pathway in *Pholidota chinensis* Lindl. revealed by transcriptome and metabolome profiling [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 1024239.

[10] Shan TY, Yin MZ, Wu JX, et al. Comparative transcriptome analysis of tubers, stems, and flowers of *Gastrodia elata* Blume reveals potential genes involved in the biosynthesis of phenolics [J]. Fitoterapia, 2021, 153: 104988.

[11] Tsai CC, Wu KM, Chiang TY, et al. Comparative transcriptome analysis of *Gastrodia elata* (Orchidaceae) in response to fungus symbiosis to identify gastrodin biosynthesis-related genes [J]. BMC Genom, 2016, 17: 212.

[12] Bai YF, Yin H, Bi HP, et al. *De novo* biosynthesis of Gastrodin in *Escherichia coli* [J]. Metab Eng, 2016, 35: 138-147.

[13] Yin H, Hu TD, Zhuang YB, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of gastrodin from glucose [J]. Microb Cell Fact, 2020, 19: 218.

[14] 刘保财, 黄颖桢, 赵云青, 等. 野生石仙桃立地环境与生长特性研究 [J]. 福建农业学报, 2017, 32(8): 864-869.
Liu BC, Huang YZ, Zhao YQ, et al. Natural habitat and growth characteristics of wild *Pholidota chinensis* lindl [J]. Fujian J Agric Sci, 2017, 32(8): 864-869.

[15] 刘保财, 胡学博, 张武君, 等. 石仙桃内参基因筛选与应用 [J]. 生物技术通报, 2026, 42(2): 158-168.
Liu BC, Hu XB, Zhang WJ, et al. Screening of internal reference gene for *Pholidota chinensis* and their applications [J]. Biotechnol Bull, 2026, 42(2): 158-168.

[16] 陈凤琼, 陈秋森, 林佳昕, 等. 番茄 *DIR* 基因家族鉴定及其对非生物胁迫响应的分析 [J]. 中国农业科学, 2022, 55(19): 3807-3821, I0001-I0003.
Chen FQ, Chen QS, Lin JX, et al. Genome-wide identification of *DIR* family genes in tomato and response to abiotic stress [J]. Sci Agric Sin, 2022, 55(19): 3807-3821, I0001-I0003.

[17] 赵玎玲, 王梦璇, 孙天杰, 等. 大豆单锌指蛋白基因 *GmSZFP* 的克隆及其在 SMV 与寄主互作中的功能 [J]. 中国农业科学, 2022, 55(14): 2685-2695.
Zhao DL, Wang MX, Sun TJ, et al. Cloning of the soybean single zinc finger protein gene *GmSZFP* and its functional analysis in SMV-host interactions [J]. Sci Agric Sin, 2022, 55(14): 2685-2695.

[18] 赵霞, 李元敏, 李依民, 等. 基于全长转录组测序的掌叶大黄 *R1-MYB* 基因家族鉴定分析 [J]. 药学学报, 2023, 58(5): 1354-1363.
Zhao X, Li YM, Li YM, et al. Identification and analysis of *R1-MYB* gene family in *Rheum palmatum* L. based on full-length transcriptome sequencing [J]. Acta Pharm Sin, 2023, 58(5): 1354-1363.

[19] Zalevsky AO, Zlobin AS, Gedzun VR, et al. PeptoGrid—rescoring function for AutoDock vina to identify new bioactive molecules from short peptide libraries [J]. Molecules, 2019, 24(2): 277.

[20] Ma WX, Wang S, Yang XY, et al. Gastrodin and gastrodigenin: advancing neurogenesis in neurological disease management [J]. Food Res Int, 2026, 232: 118882.

[21] Feng JS, Gao ST, Hu YK, et al. The dual role of gastrodin in spinal cord injury: microglial phenotype switching and neuronal survival via PI3K/AKT activation [J]. CNS Neurosci Ther, 2026, 32(4): e70811.

[22] Wan XW, Li DH, Tang MH, et al. System-level metabolic and enzyme engineering enables high-titer gastrodin biosynthesis in yeast [J]. Bioresour Technol, 2026, 454: 134802.

[23] 马迪娜, 刘启泽, 冯垒, 等. 白及中天麻素合成酶基因克隆与功能表征 [J]. 西北农业学报, 2025, 34(10): 1867-1875.
Ma DN, Liu QZ, Feng L, et al. Cloning and functional characterization of gastrodin synthase gene in *Bletilla striata* [J]. Acta Agric Boreali Occidentalis Sin, 2025, 34(10): 1867-1875.

[24] Ge L, Xia Y, Xu WX, et al. Efficient biosynthesis of gastrodin by UDP-glycosyltransferase from *Rauvolfia serpentina* [J]. J Microbiol Biotechnol, 2025, 35: e2501002.

[25] Ge L, Xu W, Jia R, et al. Recombinant expression and characterization of an alkali-tolerant UDP-Glycosyltransferase from *Solanum lycopersicum* and its biosynthesis of gastrodin[J]. J Microbiol Biotechnol, 2024, 35:e2410029.

[26] Zhang Z, Wang XY, Sha X, et al. Biosynthesis of gastrodin *via* multi-module UDPG supply and site-directed mutagensis of glycosyltransferase in *Escherichia coli* [J]. Mol Catal, 2025, 578: 114953.

[27] Wang X, Zhang JL, Li T, et al. Efficient whole-cell biotransformation for gastrodin production via glycosyltransferase engineering and process optimization [J]. Synth Syst Biotechnol, 2026, 14: 10-21.

（责任编辑　朱琳峰）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):174-185

杏果实成熟过程中*SPLs*基因的ABA响应特征与调控网络解析

张钰婧[1, 2] 陈晨[3] 苟宁宁[4] 姜楠[1*] 乌云塔娜[1*]
（1.中国林业科学研究院经济林研究所,郑州 450000；2.南京林业大学林草水保学院,南京 210000；3.新疆农业大学园艺学院,乌鲁木齐 830052；4.宁夏葡萄酒与防风治沙防沙职业技术学校,银川 750000）

摘 要： 【目的】探究*PaSPLs*在普通杏（*Prunus armeniaca*）果实成熟中的表达模式及响应外源脱落酸（abscisic acid, ABA）处理的分子机理，鉴定调控*PaSPLs*的miRNA，为后续深入研究miR156-*PaSPLs*介导ABA调控果实成熟奠定基础。【方法】以‘Sungold’为供试材料，利用生物信息学方法鉴定*PaSPL*基因家族成员，分析PaSPLs基本理化性质、保守基序、系统进化关系及启动子顺式作用元件；通过实时荧光定量PCR（RT-qPCR）分析外源ABA处理后果实*PaSPLs*基因的表达特征。通过瞬时转化烟草叶片验证PaSPLs蛋白的亚细胞定位。根据全转录组数据，构建miR156-*PaSPLs*调控网络，分析miR156和*PaSPLs*在普通杏果实成熟中的表达情况；利用STRING预测SPL互作蛋白。【结果】普通杏*PaSPL*基因家族共鉴定到15个成员，分为8个亚家族。启动子序列分析表明，存在4类参与生长发育调控的元件。表达分析结果显示，杏果实成熟过程中，*PaSPL1*和*PaSPL2*随着果实成熟表达量升高，且外源ABA处理后表达量增加，脱落酸抑制剂处理后表达量降低，而*PaSPL9*表达变化与之相反。PaSPL1、PaSPL2和PaSPL9均定位于细胞核。通过转录调控和蛋白互作预测分析，构建了miR156-*PaSPLs*表达调控网络及PaSPLs蛋白互作网络。【结论】共鉴定出15个普通杏的*PaSPLs*基因，其中*PaSPL1*和*PaSPL2*对果实成熟可能具有正向促进作用，而*PaSPL9*对果实成熟可能具有抑制作用，且均可响应ABA信号；同时miR156c可能通过负调控*PaSPL9*表达调控果实成熟，为miR156-*SPLs*与ABA协同调控果实成熟的分子机制提供理论依据。

关键词： 普通杏；果实成熟；*SPL*基因家族；脱落酸；miR156；生物信息学；基因表达；调控网络
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0040

ABA Response Characteristics and the Regulatory Network of *SPLs* during *Prunus armeniaca* Fruit Ripening

ZHANG Yu-jing[1, 2] CHEN Chen[3] GOU Ning-ning[4] JIANG Nan[1*] WUYUN Ta-na[1*]
（1. *Research Institute of Non-Timber Forestry, Chinese Academy of Forestry, Zhengzhou* 450000; 2. *College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing* 210000; 3. *College of Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi* 830052; 4. *Ningxia Technical College of Wine and Desertification Prevention, Yinchuan* 750000）

Abstract: 【Objective】 This study aimed to investigate the expression patterns of *PaSPL*s during fruit ripening in apricot (*Prunus armeniaca*) and their molecular responses to exogenous abscisic acid (ABA) treatment. Additionally, we sought to identify the miRNAs that regulate *PaSPL*s, thereby providing a foundation for further exploring the mechanism by which ABA regulates fruit ripening through the miR156-*PaSPL* module. 【Method】 Using ‘Sungold’ as the experimental material, we identified members of the *PaSPL* gene family through bioinformatics approaches and analyzed their basic physicochemical properties, conserved motifs, phylogenetic relationships, and promoter *cis*-elements. The expression features of *PaSPL*s to exogenous ABA treatment were examined by quantitative real-time PCR (RT-qPCR). Subcellular localization of PaSPL proteins was verified via transient transformation of *Nicotiana benthamiana* leaves. Based on whole-transcriptome data, we constructed the miR156-*PaSPL* regulatory network and analyzed the expression patterns of miR156 and *PaSPL*s during

收稿日期：2026-01-12
基金项目：中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金项目（CAFYBB2025QF001）
*通信作者：乌云塔娜 tanatanan@163.com，姜楠 jiangnan@caf.ac.cn

apricot fruit ripening. In addition, the STRING database was used to predict PaSPL-interacting proteins.【Result】A total of 15 members of the *PaSPL* gene family were identified in apricot and classified into eight subfamilies. Promoter sequence analysis revealed four major categories of *cis*-elements involved in growth and development regulation. Expression analysis showed that during apricot fruit ripening, the transcript levels of *PaSPL1* and *PaSPL2* increased as ripening progressed. Their expression was further upregulated after exogenous ABA treatment and downregulated following NGDA (ABA biosynthesis inhibitor) treatment. In contrast, *PaSPL9* exhibited the opposite expression pattern. Subcellular localization assays confirmed that PaSPL1, PaSPL2, and PaSPL9 were all localized in the nucleus. Using transcriptional and protein interaction prediction analyses, we constructed the miR156-*PaSPL* expression regulatory network and a PaSPL protein-protein interaction network.【Conclusion】A total of 15 *PaSPL*s were identified in apricot. Among them, *PaSPL1* and *PaSPL2* may positively promote fruit ripening, whereas *PaSPL9* may exert an inhibitory effect. All three genes are responsive to ABA signals. Furthermore, miR156c may regulate fruit ripening by negatively modulating *PaSPL9* expression. These findings provide a theoretical basis for elucidating the molecular mechanism underlying the synergistic regulation of fruit ripening by the miR156-*SPL* module and ABA.

Keywords: apricot; fruit ripening; *SPL* gene family; ABA; miR156; bioinformatics; gene expression; regulatory network

SPL（SQUAMOSA promoter-binding protein-like）基因家族是一类含有SBP（SQUAMOSA promoter-binding protein domain）结构域的转录因子，特异存在于植物中参与调控开花时间和形态建成等多个生长发育关键环节，同时也是响应逆境胁迫的重要调控因子[1-3]。SPL转录因子作为果实成熟主效调控因子的关键证据，源于对番茄（*Solanum lycopersicum*）*CNR*突变体的研究，*SlSPL-CNR*基因沉默表达后，能成功重现*CNR*突变体的典型未成熟表型，果实无法正常转色与软化，从而在功能上明确了该基因与成熟过程的因果关联[4-5]。在香蕉（*Musa acuminata* spp.）中，*MaSPL1*主要在果实发育和采后初期表达，瞬时过表达*MaSPL1*可以促进果实成熟[6]。*CpSBP1*可以结合*CpPME1/2*和*CpPDS4*启动子调节番木瓜（*Carica papaya* L.）成熟过程中的软化与着色[7]。*VcSPL12*在蓝莓（*Vaccinium* spp.）绿果期高表达，与叶绿素生物合成基因*VcDVR*的启动子结合，促进叶绿素积累，从而控制果实成熟过程中的颜色变化[8]。

已有研究揭示，*SPLs*基因与植物激素的互作呈现复杂的双向调控特征，二者协同调控植物多种生理过程。一方面SPLs可以结合激素合成或信号转导基因的启动子区域，实现对激素的合成、代谢及信号转导过程的响应与调控。例如，在番茄中，*SlSPL13*通过抑制细胞分裂素（CK）合成基因*SlIPT1*的表达抑制侧芽生长[9]。MdSPL6与独脚金内酯（SL）的信号转导基因*MdSMXL7*相互作用，通过抑制腋芽生长调控苹果（*Malus domestica*）的分枝模式[10]。香蕉中，过表达*MaSPL16*基因通过激活乙烯合成基因*MaACO1*的转录，从而加速果实的成熟过程[11]。另一方面，植物激素也可以影响*SPL*基因的表达，赤霉素（GA）信号通过解除DELLA蛋白对*AtSOC1*的抑制，增强*AtSOC1*对*AtSPL3/4/5*的直接转录激活作用，进而与光周期信号协同加速拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）开花[12]。在草莓（*Fragaria ananassa*）中，ABA处理后，草莓成熟抑制因子*FaSPL18*表达下降，促进果实成熟[13]。此外，高度保守的miR156-*SPLs*模块整合了多种植物激素信号，共同构成了植物发育时序与形态建成的核心调控框架。在苹果中，miR156h-*MdSPL13B*模块以*MdSPL13B*为枢纽，通过促进赤霉素合成基因*MdKO/MdKAO2/MdGA20ox*的表达，驱动赤霉素介导的单性结实[14]。而柑橘（*Citrus trifoliata*）中，通过miR156c-*CiSPL3/6-CiGA20ox2*调控模块则可以诱导植株矮化[15]。miR156a-*VcSPL12*模块通过靶向调控*VcACS1*和*VcACO6*的表达来改变乙烯的合成量，进而调控蓝莓果实成熟着色进程[16]。上述研究表明，miR156-*SPLs*模块和激素在果实成熟过程中存在复杂的互作网络，协同调控果实转色与软化等发育过程。

杏隶属于蔷薇科（Rosaceae）李亚科（Prunoideae），在我国“三北”地区生态环境建设中发挥重要作用。其中普通杏（*Prunus armeniaca* L.）果肉香甜而浓郁，富含维生素和人体所需矿物质。近年来，其年产量持续攀升，经济价值也随之稳步提高。成熟期是重要的经济性状，由于杏果实成熟期大多集中在6–7月，主栽品种供应期仅为20 d，极大制约了杏产业的良性发展。因此，培育不同成熟期的普通

杏品种成为杏果实育种关键目标之一，实现果实供应期延长，经济价值提高[17-18]。研究表明，外源ABA处理可加速杏果实着色和软化过程，而NDGA（ABA抑制剂）处理则会阻碍其成熟[19]。尽管*SPLs*与植物激素介导的果实成熟密切相关，但其对于ABA介导的果实成熟的响应及成熟过程中的分子调控网络仍待系统解析。

本研究通过生物信息学方法系统鉴定并解析杏*PaSPL*基因家族的分子特征，利用ABA处理，鉴定在ABA介导果实成熟过程的关键候选基因*PaSPL1*、*PaSPL2*、*PaSPL9*。基于全转录组数据分析，构建miR156-*PaSPLs*调控网络，为后续揭示miR156-*PaSPLs*模块介导ABA调控果实成熟进程的分子机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验开展于中国林业科学研究院经济林研究所孟州长期试验基地，全转录组分析所用材料为8年生普通杏‘Sungold’，共采集4个具有代表性发育时期的样本，盛花后（DAFB）63 d（绿果期，GF-1），70 DAFB（绿果期，GF-2），74 DAFB（转色期，TF）和84 DAFB（成熟期，RF）。

外源ABA处理实验参照已报道的杏果实处理方法进行[19]，分别配制1.89 mmol/L ABA溶液和0.15 mmol/L ABA抑制剂（NDGA）溶液，双蒸水（ddH_2O）作为对照。35 DAFB开始喷施果实，每隔5 d喷施一次，共计喷施4次。采集80 DAFB的实验组及对照组果实于液氮速冻，置于-80 ℃保存，用于后续RT-qPCR分析。

研究中所使用的杏（‘Sungold’‘F106’‘LWM’）、‘中油桃14号’（CN14, *Prunus persica*）和樱桃（*Prunus avium*）基因组数据均下载于蔷薇科基因组数据库（GDR，https://www.rosaceae.org/）；拟南芥基因组数据下载自拟南芥数据库（TAIR，https://www.arabidopsis.org/）；番茄基因组数据下载自番茄基因组数据库（Sol Genomics Network，https://solgenomics.net/organism/solanum_lycopersicum/genome）。

1.2 方法

1.2.1 普通杏*PaSPLs*基因及miRNA的表达模式分析 本研究所用全转录组原始数据为课题组前期测序结果，并上传至NCBI序列读取档案库（sequence read archive, SRA），对应项目登录号为PRJNA1031355。基于已鉴定的*PaSPLs*基因及候选的miRNA，通过其在不同时期的表达量数据，绘制热图，分析其在果实发育成熟过程中的表达模式。

1.2.2 普通杏*PaSPL*基因家族鉴定及理化性质分析 使用Pfam数据库（https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/pfam/）下载SBP结构域的隐马尔可夫模型（PF03110），利用TBtools-II软件中的HMM Search功能初步获取*PaSPL*基因家族成员[20]。通过NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）中的CD-Serach进一步确定含有完整SBP结构域的*PaSPL*基因家族成员。使用Expasy（https://web.expasy.org/protparam/）在线分析PaSPLs蛋白的氨基酸长度、总原子数、分子量、等电点、不稳定指数、脂肪族氨基酸指数和亲水指数等，同时使用CELLO（https://cello.life.nctu.edu.tw/）进行亚细胞定位的预测。利用NPS@（https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl page=/NPSA/npsa_sopma.html）对蛋白二级结构进行预测。使用SWISS-MODEL（https://swissmodel.expasy.org/）在线工具预测PaSPLs蛋白三维结构，根据GMQE值选择最佳模型。

1.2.3 普通杏*PaSPL*基因家族Motifs分析、互作蛋白及miR156靶向*PaSPLs*基因预测 使用MEME（https://meme-suite.org/meme/tools/meme）在线工具分析*PaSPL*家族基因Motif，并在TBtools中进行*PaSPL*基因家族Motifs可视化绘制。利用STRING（https://cn.string-db.org/）在线数据库，以拟南芥为参考模型，进行PaSPLs互作蛋白预测。从全转录组原始数据中获得microRNA的序列信息，利用psRNATarget（https://www.zhaolab.org/psRNATarget/analysis）工具，在线预测*PaSPLs*编码区及3′ UTR上miR156的潜在结合位点。

1.2.4 *PaSPL*基因家族系统进化分析 利用MEGA 12.0软件进行普通杏（15个）、西伯利亚杏（15个）、大扁杏（13个）、桃（16个）、樱桃（12个）、番茄（15个）和拟南芥（16个）*SPL*家族成员氨基酸序列比对和系统发育树分析[21]。采用ClustalW算法进行序列比对。采用最大似然法（maximum likelihood, ML）构建系统发育树，具体参数包括bootstrap=

1 000、complete deletion of gaps、JTT model。根据进化树结果进行分类，并在ChiPlot（https://www.chiplot.online/#）绘图。

1.2.5　普通杏*PaSPL*基因家族共线性及启动子顺式作用元件分析　利用TBtools软件中的MCSanX工具，整合杏、拟南芥及桃的基因组序列与基因组注释文件，进行种间共线性分析，确定不同物种间*SPL*基因家族的基因复制情况。提取*PaSPLs*基因编码区起始密码子（ATG）上游2 000 bp的启动子序列，利用在线分析工具PlantCARE（https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/）进行顺式作用元件预测与鉴定，并对各类型元件的数量进行统计分析。

1.2.6　实时荧光定量PCR（quantitative real-time PCR，RT-qPCR）分析　使用FastPure Universal Plant Total RNA Isolation Kit植物总RNA提取试剂盒（诺唯赞，南京，中国）及HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR反转录试剂盒（诺唯赞，南京，中国）进行RNA提取及cDNA反转录。使用2×SYBR Green qPCR荧光定量试剂盒（北京密码子，北京，中国）进行基因实时荧光定量，总体系20 μL（2×SYBR Green qPCR Premix 10 μL，正反向引物各0.4 μL，cDNA模板1 μL和无菌水8.2 μL），PCR扩增条件为95 ℃预变性30 s；95 ℃变性10 s，60 ℃退火延伸30 s，40个循环，所有程序均按照相应试剂盒说明书进行。RT-qPCR包括3个生物学重复和3个技术重复，以*PaUBQ*为内参基因，数据分析采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法（引物列于附表1）。

1.2.7　亚细胞定位　利用*Bam*H I和*Pst* I限制性内切酶双酶切法将*PaSPL1*、*PaSPL2*和*PaSPL9*的完整开放阅读框（ORF）克隆到pHG-EGFP载体。将35S::EGFP、35S::*PaSPL1*-EGFP、35S::*PaSPL2*-EGFP和35S::*PaSPL9*-EGFP质粒转到根癌农杆菌GV3101中，28 ℃孵育2 d。将带有阳性克隆的菌悬液［150 μmol/L乙酰丁香酮（AS），10 mmol/L MES，10 mmol/L氯化镁，ddH_2O］注射到烟草叶片中，25 ℃孵育3 d。mCherry被用作细胞核marker。使用徕卡TCS SP8共聚焦显微镜观察EGFP荧光（激发波长488 nm）和mCherry荧光（激发波长561 nm）（引物列于附表2）。

1.2.8　数据分析　使用JASP 0.96.0进行单因素方差分析（ANOVA）；$P<0.05$表示差异显著[22]。所有实验均设3个重复。使用GraphPad Prism 8.0.2绘制柱形图，使用TBtools绘制热图，使用Cytoscape3.10.4绘制miRNA-*PaSPLs*调控网络图和PaSPLs蛋白互作网络图。

2　结果

2.1　普通杏*PaSPL*基因家族鉴定和蛋白理化性质及结构分析

利用Pfam数据库和NCBI数据库最终鉴定出15个包含完整SBP结构域的PaSPLs蛋白，根据其编码基因在染色体上的位置，分别命名为PaSPL1-PaSPL15。对PaSPL家族理化性质进行分析，结果（附表3）显示，PaSPL家族的编码氨基酸数量介于162（PaSPL11）-1 070（PaSPL13）之间，总原子数为2 528-16 960个，分子量范围为18.44-118.40 kD。等电点范围为5.11-9.67，其中PaSPL2、PaSPL3和PaSPL12等电点均小于7，为酸性蛋白，其余为碱性蛋白。不稳定指数介于44.92-85.32之间，均大于40，属于不稳定蛋白。脂肪族氨基酸指数在37.12-82.85之间，其中PaSPL11和PaSPL12脂肪族氨基酸指数小于40，表明该蛋白热稳定性较差。亲水指数范围为-1.555 - -0.41，均为亲水性蛋白。亚细胞定位预测结果表明，PaSPL家族均定位于细胞核内。PaSPL家族15个成员蛋白二级结构中，α-螺旋占比10.42%-36.42%，β-折叠占比1.23%-4.32%，延伸链占比4.44%-9.44%，无规则卷曲占比53.70%-83.12%。PaSPLs蛋白三级结构呈现的是α-螺旋、无规则卷曲等二级结构元件的空间排布，反映了PaSPLs蛋白的三维折叠方式，这是蛋白发挥功能的基础结构（附图1）。

2.2　普通杏*PaSPL*基因家族系统进化分析

为进一步探究普通杏*PaSPL*基因家族成员的进化关系，本研究将其与仁用杏、桃、樱桃、番茄和拟南芥的SPL氨基酸序列进行对比和聚类分析。参照拟南芥AtSPL蛋白的分类标准，将普通杏PaSPL蛋白分为8个亚家族（图1）。为进一步探究其潜在功能，对部分已报道的不同物种*SPL*基因功能进行汇总（表1），为PaSPLs蛋白的功能注释提供参考。

第I亚家族中仅包含PaSPL3一个成员，推测其可能参与铜代谢及金属离子平衡调控。第II亚家族成员最多，包含PaSPL1、PaSPL2和PaSPL13，推测其

主要参与植物生殖生长调控。第III亚家族成员为PaSPL7，其可能参与花发育及雄性育性调控。第IV亚家族仅包含PaSPL6一个成员，预示其可能参与调控胁迫响应过程。第V亚家族成员为PaSPL5，推测其可能参与调控植物形态建成和果实成熟。第VI亚家族中包含PaSPL11和PaSPL12，推测其在成花转变、植物形态建成及果实成熟过程中发挥重要作用。第VII亚家族成员为PaSPL4和PaSPL9，可能在植物生长发育和果实成熟过程中发挥重要功能；第VIII亚家族成员最多，包含PaSPL8、PaSPL10、PaSPL14和PaSPL15，可能在营养-生殖生长转变中发挥重要作用。种内不同基因型（Sungold、LWM、F106）的同源PaSPL蛋白大多聚类为近缘分支但数量存在差异，体现了该基因家族的编码蛋白在不同杏种质中的高度保守性和分化趋势。进一步分析表明，杏PaSPL蛋白与桃、樱桃的同源蛋白亲缘关系较近，而与番茄和拟南芥的同源蛋白亲缘关系相对较远。

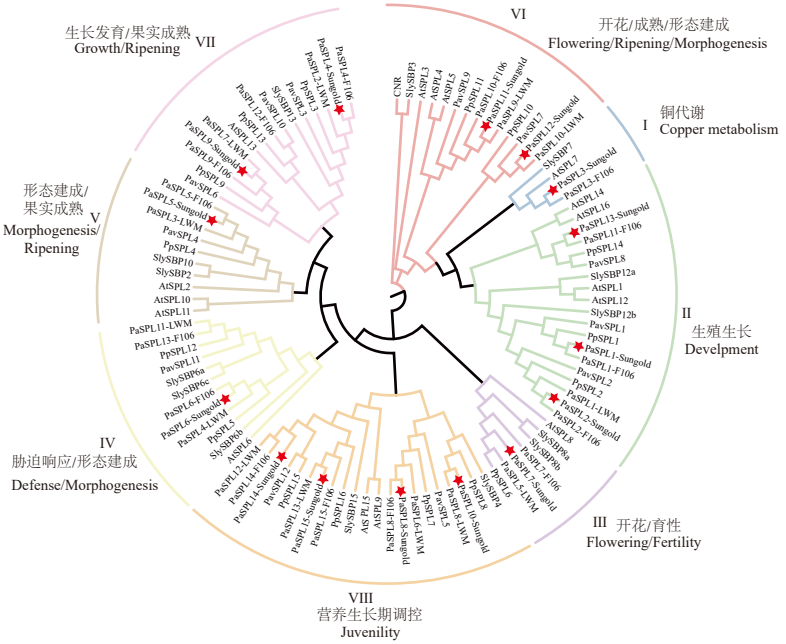


图1 普通杏‘Sungold’、西伯利亚杏‘F106’、大扁杏‘LWM’、拟南芥、番茄、樱桃和桃SPL家族蛋白质系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of SPL family proteins in *Prunus armeniaca* ‘Sungold’, *P. sibirica* ‘F106’, *P. armeniaca* × *P. sibirica* ‘LWM’, *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum*, *P. avium* and *P. persica*

表1 SPL转录因子在不同物种中的功能

Table 1 Function of SPL transcription factors in various plant species

物种 Species	基因 Gene	功能 Function	拟南芥同源基因 *Arabidopsis* ortholog gene	杏同源基因 Apricot ortholog gene
香蕉 *Musa acuminata*	*MaSPL1*	果实成熟	*AtSPL3/4/5*	*PaSPL11/12*
	MaSPL16	果实成熟	*AtSPL13*	*PaSPL4/9*
蓝莓 *Vaccinium* spp.	*VvSPL2*	果实成熟	*AtSPL2/10/11*	*PaSPL5*
苹果 *Malus domestica*	*MdSPL6*	株型	*AtSPL6*	*PaSPL6*
	MdSPL13B	单性结实	*AtSPL13*	*PaSPL4/9*
柑橘 *Citrus reticulata*	*CiSPL2*	果实成熟	*AtSPL2*	*PaSPL5*
	CiSPL3	株型	*AtSPL3/4/5*	*PaSPL11/12*
	CiSPL6	株型	*AtSPL6*	*PaSPL6*

2.3　普通杏PaSPLs蛋白保守基序分析

为了进一步探究普通杏PaSPL家族成员蛋白基序的保守性，通过MEME分析，共鉴定出10个保守基序，命名为Motif1－Motif10。Motif1和Motif2为PaSPLs蛋白较为保守的基序，在所有家族成员的蛋白序列上均有分布（图2）。亚家族内部成员蛋白保守基序大多类似，其中III、IV、V、VI和VII亚家族成员仅包含Motif1和Motif2。VIII亚家族成员中仅PaSPL14和PaSPL15包含Motif7。I亚家族成员和II亚家族成员含有Motif3、Motif5和Motif8，并且II亚家族成员含有Motif数量最多，其中PaSPL1和PaSPL2编码的蛋白含有9个Motif，PaSPL13编码的蛋白含有8个Motif，且其Motif4、Motif6和Motif9为该亚家族特有的。由此推测这些特有的Motif可能与亚家族特异性功能分化有关，而Motif1和Motif2是维持家族蛋白核心功能的关键保守基序。

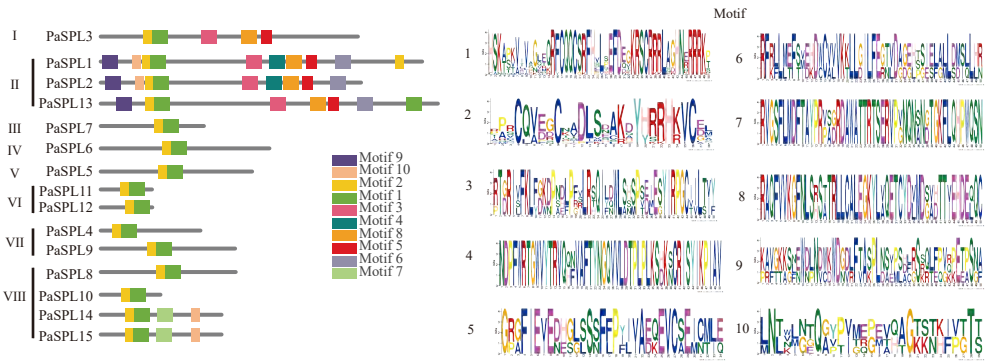


图2　普通杏*PaSPLs*基因家族保守基序分析

Fig. 2　Conserved motif analysis of the *PaSPLs* gene family in *P. armeniaca*

2.4　普通杏*PaSPL*基因家族共线性分析

为了揭示*PaSPL*基因家族通过全基因组复制或串联复制等机制在物种内的收缩扩张情况，对普通杏*PaSPL*基因家族内部进行共线性分析，结果表明，*PaSPLs*基因内部存在两对共线性基因，*PaSPL9*和*PaSPL4/5*，*PaSPL6*和*PaSPL13*，且存在3对串联重复基因，*PaSPL1*和*PaSPL2*、*PaSPL4*和*PaSPL5*、*PaSPL7*和*PaSPL8*（图3-A）。普通杏和仁用杏种间*PaSPL*基因家族的保守性和进化关系比较结果表明，普通杏*PaSPLs*基因与西伯利亚杏的同源基因（8对）数量多于大扁杏（6对）。杏种间Chr1、Chr2、Chr5和Chr6存在*PaSPLs*基因的复制现象。其中在普通杏和西伯利亚杏进化过程中，Chr1和Chr5上的*PaSPLs*基因发生了复制现象，导致*PaSPLs*基因扩张。而在普通杏和大扁杏进化过程中，大扁杏Chr7并未发生复制现象，导致*PaSPLs*基因收缩。为了比较不同物种之间*SPL*基因家族的保守性和进化关系，揭示*SPLs*基因潜在功能及其在物种间的进化保守位点，对普通杏*PaSPL*基因家族和拟南芥、桃*SPL*基因家族进行种间共线性分析。结果显示（图3-B），普通杏与桃同源的*SPLs*基因（8对）多于拟南芥（5对）。普通杏和拟南芥Chr1和Chr5上存在*SPLs*基因复制现象，普通杏和桃Chr1、Chr2、Chr5和Chr6上存在*PaSPLs*基因复制现象，且普通杏Chr1在桃的Chr1、Chr3和Chr5上都发生了*SPLs*的复制现象。其中*PaSPL3*、*PaSPL4*、*PaSPL5*、*PaSPL6*和*PaSPL13*在上述物种中均存在同源基因，暗示这些基因在双子叶植物分化及物种发育过程中较保守。上述结果为*PaSPLs*基因的功能保守性与分化特征提供了染色体层面的支撑。

2.5　普通杏*PaSPL*家族成员启动子顺式元件分析

为了揭示*PaSPLs*基因在转录调控层面的保守性与多样性，进一步分析*PaSPLs*基因上游2 kb启动子区，结果显示（图4），*PaSPL*家族成员启动子上存在4大类顺式作用元件：激素响应元件（脱落酸、生长素、乙烯、赤霉素和茉莉酸甲酯）占比33.8%，逆境胁迫响应元件（厌氧、低温、干旱、损伤修复、病原菌非生物胁迫防御与应答）占比15.9%，光响

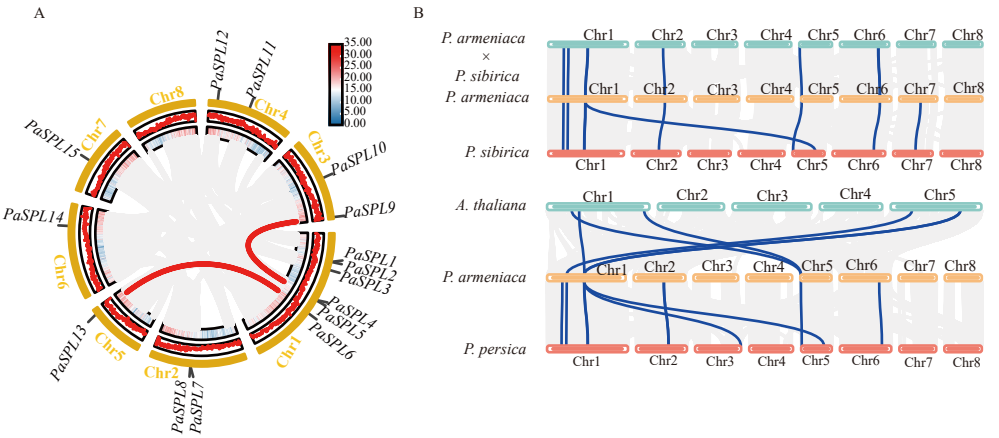


图3 普通杏*PaSPLs*基因种内(A)与物种间(B)共线性分析

Fig. 3 Collinearity analysis of *PaSPLs* genes within species (A) and between species (B) in *P. armeniaca*

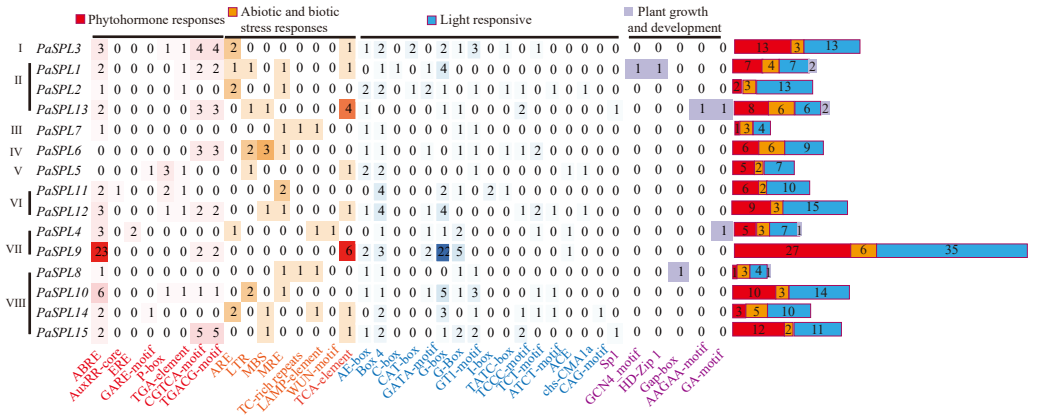


图4 普通杏*PaSPL*基因家族启动子顺式元件分析

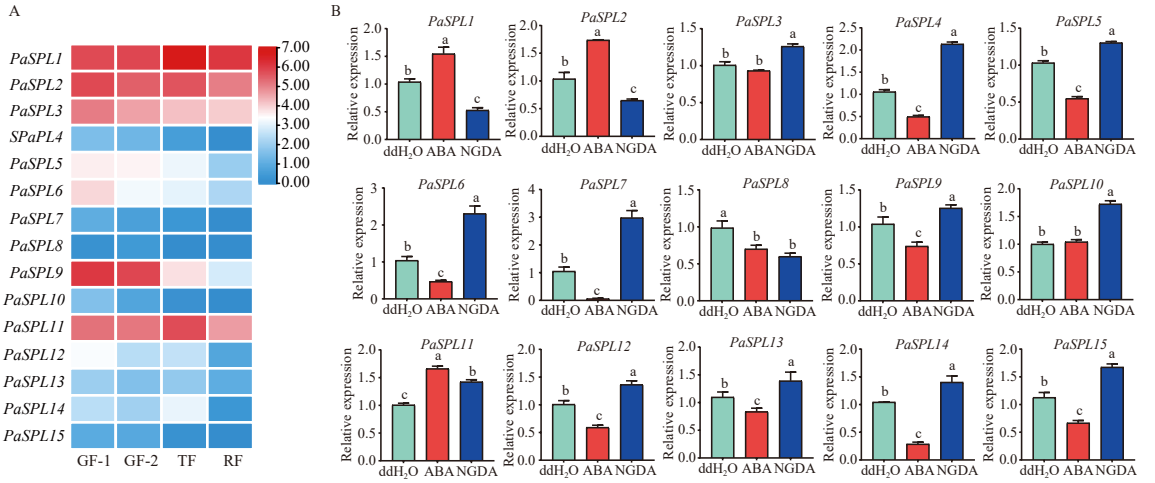
Fig. 4 Analysis of the *cis*-elements in the promoter region of the *PaSPL* gene family in *P. armeniaca*

应元件（参与光合作用、光周期、叶绿素合成、激素信号、种子萌发、胚乳发育、植物发育）占比48.5%，生长发育调控元件（胚乳表达、分生组织发育、膜结合、花器官发育与叶片发育）占比0.02%。其中*PaSPL9*启动子区域响应元件数量最多、分布特征最为突出，ABA响应元件（ABRE）与光响应元件富集程度处于较高水平。说明该基因在整合植物激素与环境光信号介导的响应逆境胁迫（如干旱、高盐）、光周期变化或成熟等生理过程中发挥关键作用。

2.6 普通杏*PaSPL*基因家族的表达模式及ABA处理响应情况

为解析*PaSPLs*基因在杏果实发育成熟过程中的功能，本研究分析了绿果期至成熟果实的*PaSPL*基因家族成员表达情况。结果显示（图5-A），*PaSPL1*、*PaSPL2*和*PaSPL11*在果实发育成熟过程中持续高表达，与果实成熟呈正相关，可能具有正调控果实成熟的作用。*PaSPL3*和*PaSPL9*随着果实成熟表达量降低，与果实成熟呈负相关，可能具有负调控果实成熟的作用。其余*PaSPLs*则在该过程中处于低水平表达状态。由于ABRE元件几乎存在于每一个*PaSPL*基因家族成员的启动子区域，在此基础上，我们分别使用外源ABA及其抑制剂NGDA处理杏果实。结果表明，*PaSPL8*表达水平在外源ABA及NGDA处理后下降，*PaSPL11*则在二者处理后表达水平升高；*PaSPL3*和*PaSPL10*仅在NGDA处理后表达水平升

高。*PaSPL1*和*PaSPL2*在ABA处理后表达水平升高，NGDA处理后表达水平降低；包括*PaSPL9*在内的其余*PaSPLs*基因在ABA处理后表达水平降低，NGDA处理后表达水平升高（图5-B）。综上所述，*PaSPL1*、*PaSPL2*和*PaSPL9*可能通过ABA调节杏果实成熟。其中，*PaSPL1*和*PaSPL2*可能作为ABA信号通路下游的正向调控因子，而*PaSPL9*可能作为ABA信号通路下游的负向调控因子，参与杏果实成熟。



GF-1:63 DAFB,绿果期-1;GF-2:70 DAFB,绿果期-2;TF:74 DAFB,转色期;RF:84 DAFB,成熟期。不同字母表示在0.05水平上差异显著(P<0.05)。下同

GF-1: 63 DAFB, green fruit stage-1; GF-2: 70 DAFB, green fruit stage-2; TF: 74 DAFB, turning fruit stage; RF: 84 DAFB, ripening fruit stage. Different letters indicate significant differences at 0.05 level (P < 0.05). The same below

图5　普通杏*PaSPLs*在不同发育时期(A)及响应外源ABA处理(B)的表达量变化

Fig. 5　Changes in the expression of *PaSPLs* in *P. armeniaca* at different developmental stages (A) and in response to exogenous ABA treatment (B)

2.7　PaSPLs蛋白亚细胞定位与互作分析

为了推断PaSPLs蛋白潜在的分子功能及参与的生物学通路，对上述候选的3个PaSPLs蛋白进行亚细胞定位。结果表明，PaSPL1、PaSPL2和PaSPL9定位于细胞核内，可能具有转录调控功能（图6-A）。PaSPLs蛋白互作网络预测结果显示（图6-B），多个生长发育相关蛋白可与不同PaSPLs蛋白发生潜在互作。其中，PaAGL8可能与PaSPL4/6/7/11/13/14及PaSOC1相互作用；PaAGL42则与PaSBP2、PaSPL7/11/14存在潜在互作关系；PaSOC1与PaSBP2的互作模式高度相似，均可能与PaSPL1/4/6/7/11/13/14结合，且PaSBP2还可单独与PaSPL5互作。此外，PaDPL1可能与PaSPL1/3/6/7/11/13存在互作关系，表明PaSPLs可能参与生长发育过程，且不同PaSPLs可能具有特异功能。

2.8　miR156在*PaSPLs*基因中的靶位点及调控网络

为探究miR156介导*PaSPLs*基因转录后调控的机制，基于前期全转录组鉴定的杏miR156序列，预测*PaSPLs*基因编码区及3′-UTR上miR156结合的靶位点。结果表明，成熟的miR156序列高度保守，包含20个保守的碱基位点；与保守序列相比，miR156c存在1个碱基变异，miR156h_1存在2个碱基变异（图7-A）。在15个*PaSPLs*基因中，共发现了7个可能被miR156调控的*PaSPLs*基因，分别是*PaSPL4/5/6/8/9/14/15*，属于Ⅳ、Ⅴ、Ⅶ和Ⅷ亚家族。且在这些*PaSPLs*的编码区均存在与miR156结合的潜在位点（图7-B）。进一步利用全转录组数据构建miRNA-*PaSPLs*共表达网络。结果显示（图7-C），共有48对miRNA-*PaSPLs*调控模块，其中包含42对miR156-*PaSPLs*模块。表达分析结果显示，仅有miR156c随着成熟度升高表达量升高，其余miRNA成员表达量很低（图7-D）。因此，miR156c可能通过抑制其潜在靶基因*PaSPL9*的表达从而调节果实成熟，为深入解析miR156-*PaSPLs*模块调控杏

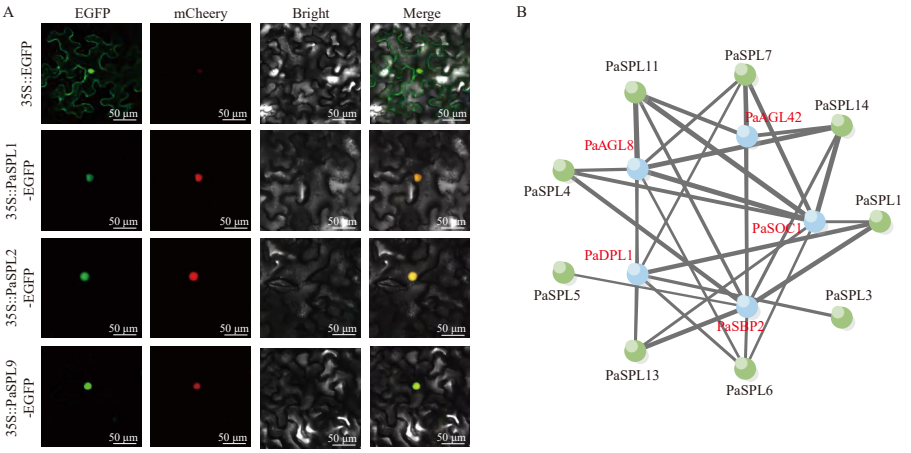


图6 普通杏PaSPLs的亚细胞定位(A)及蛋白质相互作用分析(B)

Fig. 6 Subcellular localization (A) and protein interaction analysis (B) of *PaSPL* in *P. armeniaca*

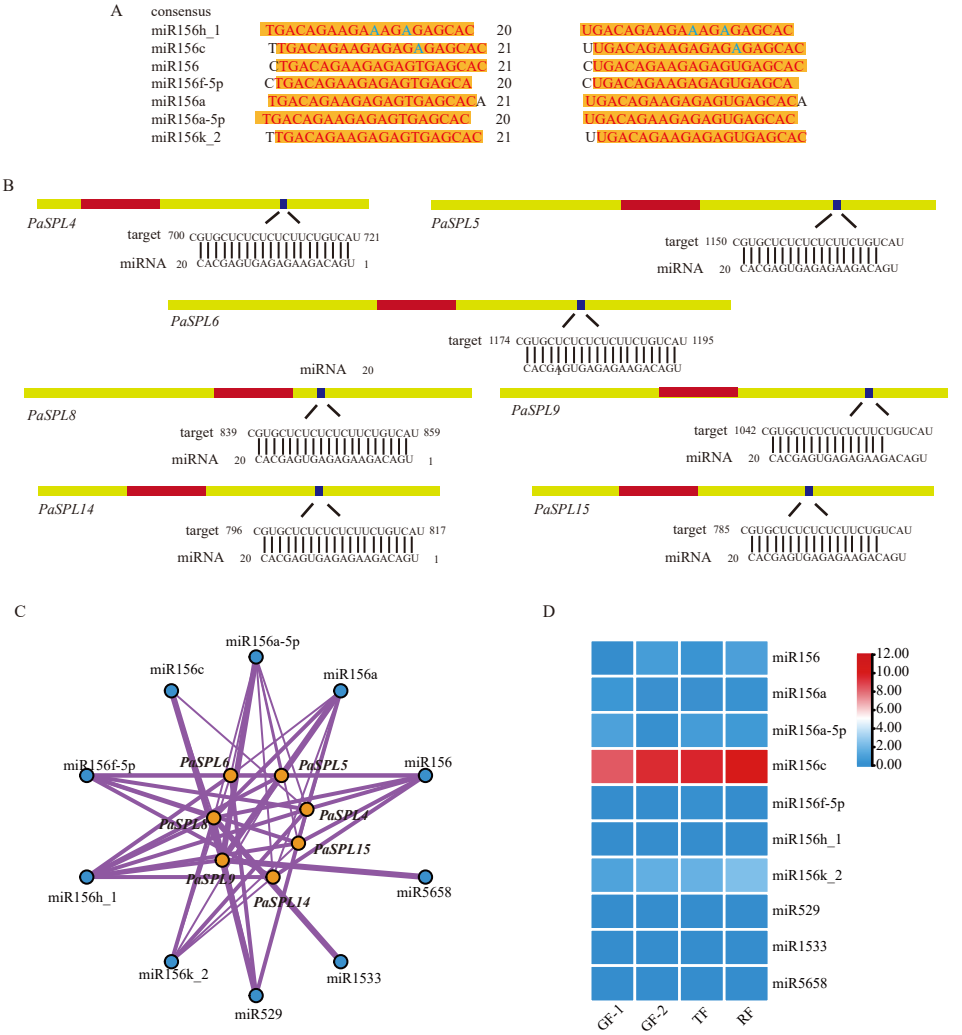
果实成熟提供了新的视角。

3 讨论

*SPLs*基因参与调控植物发育的多个核心生物学过程。目前，科研人员已在拟南芥[23]、番茄[24]、草莓[25]、樱桃[26]、苹果[27]、欧李（*Cerasus humilis*）[28]、核桃（*Juglans regia* L.）[29]等多个物种中完成了*SPL*家族成员的鉴定和验证工作，推动了对*SPLs*基因表达调控模式及生物学功能的系统解析。上述不同蔷薇科物种间*SPL*基因家族成员数量存在明显差异（草莓14个，樱桃12个，苹果18个），这一差异可能反映了*SPL*基因家族在进化过程中收缩与扩张的动态变化，在一定程度上也暗示了蔷薇科植物在长期进化历程中的物种特异性分化特征。本研究中，西伯利亚杏鉴定出15个*SPL*基因家族成员，大扁杏为13个；大扁杏*SPL*基因家族成员数量略少，提示在不同杏种质的基因组分化过程中，该基因家族可能发生了收缩事件。类似的基因家族数量分化现象在其他物种中也有报道，如栽培苹果中鉴定出132个*WRKY*家族成员，新疆野苹果为121个[30]。20个大麦基因组中鉴定出161-176个*bHLH*基因[31]。此外，柠檬酸合酶基因家族在杏中发生了潜在的特异性扩张，该家族在杏基因组中含有3个成员，而其他李属物种仅含有2个[32]。上述结果表明，基因家族的收缩和扩张是植物进化中的普遍动态特征，该过程可能与物种的环境适应及性状分化密切相关[33]。

*SPLs*基因在果实成熟进程中扮演着至关重要的调控角色。在草莓果实发育周期内，*SPLs*基因在果实绿色膨大阶段呈高表达模式，而在果实成熟初期表达水平显著降低[25]。本研究中，*PaSPL9*在杏果实成熟过程中呈现出相似的表达趋势，而*PaSPL1*和*PaSPL2*则呈现相反趋势。*PaSPLs*基因启动子区富集ABA响应元件，且其表达显著受ABA处理诱导，这与前人报道的*SPLs*基因响应ABA信号特征一致[26, 34]，本研究进一步发现，ABA处理抑制了*PaSPL9*的表达，同时促进*PaSPL1*和*PaSPL2*的表达。外源ABA和NDGA处理已被证实可以有效促进或抑制果实成熟，进一步证明*SPLs*基因可以参与ABA介导的果实成熟。*PaSPL1*和*PaSPL2*的同源基因*AtSPL1/12*可以依赖于PYL蛋白参与的ABA信号通路调控植株发育[35]。此外，AtSPL9可以通过与ABI5互作并被SnRK2s磷酸化，增强ABA信号通路响应，从而使植物适应环境胁迫[36]。表明尽管*SPL*基因在不同物种的生长发育进程中可能承担差异化的调控功能，但其功能均可通过ABA通路介导完成，凸显了这一调控路径的进化保守性，进一步说明*PaSPL*基因可能依赖ABA通路参与杏果实成熟过程。

miR156作为一类特异性靶向SPL转录因子的非编码RNA，是调控生长发育进程的核心分子模块之一。已有研究报道*SPL*家族成员并不能都被miR156靶定，如拟南芥*AtSPL1/7/8/12/14/16*并不是miR156



A：7个miR156家族成员成熟序列比对；B：*PaSPL4/5/6/8/9/14/15*基因中miR156靶位点；黄色方框代表*PaSPLs*基因编码区，紫色方框代表SBP结构域，蓝色方框代表miR156靶位点；C：miRNAs与*PaSPLs*基因的调控网络；D：miRNAs在普通杏不同发育时期的表达量变化

A: Alignment of mature sequences of seven miR156 family members. B: miR156 target sites in *PaSPL4/5/6/8/9/14/15* genes. Yellow boxes represent the coding sequences (CDS) of *PaSPLs* genes, purple boxes represent the SBP domain, and blue boxes represent the miR156 target sites. C: Regulatory network between miRNAs and *PaSPLs* genes. D: Expression variation of miRNAs in common apricot at different developmental stages

图7　普通杏miR156结合*PaSPLs*基因的靶位点及调控网络分析

Fig. 7　Analysis of target site prediction and regulatory network of miR156-*PaSPLs* in *P. armeniaca*

的靶点[37-39]。本研究通过全转录组数据及靶位点预测综合分析发现，在miR156-*PaSPLs*的调控网络中，*PaSPL1*与*PaSPL2*均未被预测为miR156的靶基因；系统发育结果进一步显示，这两个基因与拟南芥中不受miR156调控的*AtSPL1*和*AtSPL12*属于同一进化亚家族。miR156c的表达水平随果实成熟进程逐渐升高，靶基因*PaSPL9*的表达趋势相反。这一表达模式的反向变化特征表明，miR156c可能通过负调控*PaSPL9*的表达，参与ABA介导的杏果实成熟的分子调控过程。这一结果与他人研究结果相似，其中miR156b/c/d可以通过负向调控*VvSPL9*的表达参与葡萄（*Vitis vinifera* L.）果实发育和成熟过程，且该模块还可响应ABA、GA等多种激素信号调控葡萄果实着色[40]。在柑橘（*Citrus sinensis* L.）中，miR156k可通过靶向抑制负调控因子*SPL2*的表达促进果实成熟，而*SPL2*能直接结合ABA信号转导途径

关键基因*PYL2*的启动子并抑制其表达，最终延缓果实成熟[41]。因此，杏果实成熟过程中可能存在miR156c-*PaSPL9*介导的ABA调控机制，miR156c-*PaSPL9*对杏果实成熟的功能及*PaSPLs*响应ABA调控果实成熟的分子机制仍需深入解析。而本研究为miR156-*SPLs*调控杏果实成熟提供了新的理论依据，也为后续机制研究奠定了基础。相关发现不仅丰富了果实成熟调控的网络机制，为解析转录因子与激素信号互作的复杂调控模式提供了切入点，也为未来通过基因编辑或分子育种手段精准调控杏果实成熟进程、改善果实贮藏性与商品性提供了潜在的靶点与理论支撑。

4 结论

在普通杏品种‘Sungold’中，共鉴定出15个*PaSPL*基因家族成员，分为8个亚家族。*PaSPL1*、*PaSPL2*可能正向调控果实成熟进程，*PaSPL9*则发挥反向调控作用，三者均为调控果实成熟的关键候选基因。*PaSPL1*、*PaSPL2*和*PaSPL9*的表达特征与果实成熟过程密切相关，是调控杏果实成熟的关键候选基因。miR156c-*PaSPL9*模块可能作为核心调控单元，通过参与ABA合成或信号转导途径，参与杏果实成熟的分子调控网络。

文章所有附图附表请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260601153248_NewsFile_29.pdf）。

参考文献

[1] Yao T, Park BS, Mao HZ, et al. Regulation of flowering time by SPL10/MED25 module in *Arabidopsis* [J]. New Phytol, 2019, 224(1): 493-504.

[2] Wang L, Ming LC, Liao KY, et al. Bract suppression regulated by the miR156/529-SPLs-NL1-PLA1 module is required for the transition from vegetative to reproductive branching in rice [J]. Mol Plant, 2021, 14(7): 1168-1184.

[3] Jadhao KR, Kale SS, Chavan NS, et al. Genome-wide analysis of the SPL transcription factor family and its response to water stress in sunflower (*Helianthus annuus*) [J]. Cell Stress Chaperones, 2023, 28(6): 943-958.

[4] Lai TF, Wang Y, Zhou T, et al. Virus-induced LeSPL-CNR silencing inhibits fruit ripening in tomato [J]. J Agric Sci, 2015, 7(7): 184-195.

[5] Manning K, Tör M, Poole M, et al. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening [J]. Nat Genet, 2006, 38(8): 948-952.

[6] Wang B, Dou TX, Sheng O, et al. Characterization of *SPL* family genes in banana reveals the critical role of MaSPL1 in regulating fruit ripening [J]. Horticulturae, 2025, 11(6): 576.

[7] Han YC, Gao HY, Chen HJ, et al. The involvement of papaya CpSBP1 in modulating fruit softening and carotenoid accumulation by repressing CpPME1/2 and CpPDS4 [J]. Sci Hortic, 2019, 256: 108582.

[8] Li XY, Hou YM, Xie X, et al. A blueberry miR156a-SPL12 module coordinates the accumulation of chlorophylls and anthocyanins during fruit ripening [J]. J Exp Bot, 2020, 71(19): 5976-5989.

[9] Chen SY, Song XW, Zheng QX, et al. The transcription factor SPL13 mediates strigolactone suppression of shoot branching by inhibiting cytokinin synthesis in *Solanum lycopersicum* [J]. J Exp Bot, 2023, 74(18): 5722-5735.

[10] Fan XQ, Li HX, Xiong Y, et al. Strigolactones inhibit axillary bud outgrowth through transcription factor MdSPL6-mediated regulation of ABA levels in apple [J]. Plant Physiol, 2025, 199(3): kiaf517.

[11] Wei W, Yang YY, Wu CJ, et al. MaSPL16 positively regulates fruit ripening in bananas via the direct transcriptional induction of MaNAC029 [J]. Hortic Adv, 2023, 1: 10.

[12] Jung JH, Ju Y, Seo PJ, et al. The SOC1-SPL module integrates photoperiod and gibberellic acid signals to control flowering time in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2012, 69(4): 577-588.

[13] Li DD, Mou WS, Xia R, et al. Integrated analysis of high-throughput sequencing data shows abscisic acid-responsive genes and miRNAs in strawberry receptacle fruit ripening [J]. Hortic Res, 2019, 6: 26.

[14] Wang DR, Zhang CL, Wang X, et al. microRNA156-SPL13B module induces parthenocarpy through the gibberellin pathway [J]. Plant Biotechnol J, 2025, 23(12): 5536-5549.

[15] Chen M, Zhang TL, Zhang WB, et al. miR156-SPLs module regulates flowering and controls plant height by modulating gibberellin biosynthesis in citrus [J]. Plant Biotechnol J, 2025, 23(10): 4271-4289.

[16] Li HX, Wang SW, Zhai LL, et al. The miR156/SPL12 module orchestrates fruit colour change through directly regulating ethylene production pathway in blueberry [J]. Plant Biotechnol J, 2024, 22(2): 386-400.

[17] 吴锦秋, 白海坤, 王楚, 等. 不同砧穗组合对杏果实大小及品质的影响 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2025, 53(9): 93-103.
Wu JQ, Bai HK, Wang C, et al. Effects of different rootstock-scion

combinations on fruit size and quality of apricot [J]. J Northwest A F Univ Nat Sci Ed, 2025, 53(9): 93-103.

[18] 陈学森, 王楠, 彭福田, 等. 中国重要落叶果树果实品质和熟期育种研究进展 [J]. 园艺学报, 2024, 51(1): 8-26.
Chen XS, Wang N, Peng FT, et al. Advances in quality and maturity breeding of important deciduous fruit trees in China [J]. Acta Hortic Sin, 2024, 51(1): 8-26.

[19] Jia MX, Feng J, Zhang LN, et al. PaPYL9 is involved in the regulation of apricot fruit ripening through ABA signaling pathway [J]. Hortic Plant J, 2022, 8(4): 461-473.

[20] 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.

[21] Kumar S, Stecher G, Suleski M, et al. MEGA12: molecular evolutionary genetic analysis version 12 for adaptive and green computing [J]. Mol Biol Evol, 2024, 41(12): msae263.

[22] Love J, Selker R, Marsman M, et al. JASP: graphical statistical software for common statistical designs [J]. J Stat Soft, 2019, 88(2): 1-17.

[23] Cardon G, Höhmann S, Klein J, et al. Molecular characterisation of the *Arabidopsis SBP-box* genes [J]. Gene, 1999, 237(1): 91-104.

[24] Salinas M, Xing SP, Höhmann S, et al. Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family of transcription factors in tomato [J]. Planta, 2012, 235 (6): 1171-1184.

[25] Xiong JS, Zheng D, Zhu HY, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the *SPL* gene family in woodland strawberry *Fragaria vesca* [J]. Genome, 2018, 61(9): 675-683.

[26] Sun YT, Wang YY, Xiao YQ, et al. Genome-wide identification of the *SQUAMOSA* promoter-binding protein-like (SPL) transcription factor family in sweet cherry fruit [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(3): 2880.

[27] 张晓辉, 魏小春, 李锡香, 等. 苹果全基因组*SBP-box*基因家族分析及代表成员的分子克隆 [J]. 园艺学报, 2014, 41(2): 215-226.
Zhang XH, Wei XC, Li XX, et al. Genome-wide analysis of *SBP*-box gene family and molecular cloning of its typical members in *Malus* × *domestica* [J]. Acta Hortic Sin, 2014, 41(2): 215-226.

[28] 李天源, 亓新亮, 刘珊, 等. 欧李*SPL*基因家族的鉴定及在果实发育过程中的表达分析 [J]. 生物技术通报, 2026, 42(3): 362-373.
Li TY, Qi XL, Liu S, et al. Identification of *Cerasus humilis SPL* gene family and expression analysis during fruit development [J]. Biotechnol Bull, 2026, 42(3): 362-373.

[29] 阿丽亚·外力, 陈永坤, 克拉热木·克里木江, 等. 核桃*SPL*基因家族的系统进化和表达分析 [J]. 生物技术通报, 2024, 40(6): 180-189.
ALIYA W, CHEN YK, KELAREMU K, et al. Phylogenetic evolution and expression analysis of *SPL* gene family in *Juglans regia* [J]. Biotechnol Bull, 2024, 40(6): 180-189.

[30] 李静, 房震, 李美芸, 等. 新疆野苹果*WRKY*基因家族鉴定及低温沙藏过程中的表达模式分析 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2026, 54(1): 9-23.
Li J, Fang Z, Li MY, et al. Identification of *WRKY* gene family in *Malus sieversii* and analysis of its expression patterns during low-temperature sand storage [J]. J Northwest A&F Univ Nat Sci Ed, 2026, 54(1): 9-23.

[31] Tong C, Jia Y, Hu HF, et al. Pangenome and pantranscriptome as the new reference for gene-family characterization: a case study of basic helix-loop-helix (*bHLH*) genes in barley [J]. Plant Commun, 2025, 6(1): 101190.

[32] Jiang FC, Zhang JH, Wang S, et al. The apricot (*Prunus armeniaca* L.) genome elucidates Rosaceae evolution and beta-carotenoid synthesis [J]. Hortic Res, 2019, 6: 128.

[33] Magadum S, Banerjee U, Murugan P, et al. Gene duplication as a major force in evolution [J]. J Genet, 2013, 92(1): 155-161.

[34] Li L, Xu JB, Zhu ZW, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the SPL transcription factor family and its response to abiotic stress in *Pisum sativum* L [J]. BMC Genom, 2024, 25: 539.

[35] Chao LM, Liu YQ, Chen DY, et al. *Arabidopsis* transcription factors SPL1 and SPL12 confer plant thermotolerance at reproductive stage [J]. Mol Plant, 2017, 10(5): 735-748.

[36] Dong HX, Yan SL, Jing YX, et al. miR156-targeted SPL9 is phosphorylated by SnRK2s and interacts with ABI5 to enhance ABA responses in *Arabidopsis* [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 708573.

[37] Pérez-Antón M, Schneider I, Kroll P, et al. Explosive seed dispersal depends on SPL7 to ensure sufficient copper for localized lignin deposition via laccases [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119(24): e2202287119.

[38] Li CL, Lu SF. Molecular characterization of the *SPL* gene family in *Populus trichocarpa* [J]. BMC Plant Biol, 2014, 14(1): 131.

[39] Xing SP, Salinas M, Höhmann S, et al. miR156-targeted and nontargeted SBP-box transcription factors act in concert to secure male fertility in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2011, 22(12): 3935-3950.

[40] Su ZW, Wang XC, Xuan XX, et al. Characterization and action mechanism analysis of VvmiR156b/c/d-VvSPL9 module responding to multiple-hormone signals in the modulation of grape berry color formation [J]. Foods, 2021, 10(4): 896.

[41] Zhang L, Xu CY, Xu YH, et al. The miR156k- SQUAMOSA promoter-binding protein-like2 module regulates the abscisic acid receptor PYL 2 during citrus fruit ripening [J]. Plant Physiol, 2025, 198(3): kiaf278.

（责任编辑　高洁）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):186-195

*ApGA20ox1*通过赤霉素代谢途径正向调控早花百子莲开花

岳建华[1, 2] 方婷婷[1] 陈冠群[2] 申晓辉[2*]
（1.信阳农林学院园艺学院,信阳 464100; 2.上海交通大学设计学院,上海 200240）

摘 要:【目的】揭示赤霉素（gibberellin, GA）合成酶关键基因*ApGA20ox1*调控早花百子莲（*Agapanthus praecox*）开花的机制，为其开花调控及遗传改良提供依据。【方法】提取早花百子莲叶片RNA，利用RACE法克隆*ApGA20ox1*基因，并进行序列同源性比对、亚细胞定位及原核表达分析；将该基因在拟南芥中进行异源过表达，在早花百子莲中通过RNA干扰（RNA interference, RNAi）技术沉默内源*ApGA20ox1*基因的表达，研究其开花调控功能，并结合GA靶向代谢组学和转录组测序，分析转基因早花百子莲GAs含量变化及开花相关基因的表达模式。【结果】从早花百子莲中克隆获得*ApGA20ox1*基因，其ORF全长为1 086 bp，编码361个氨基酸，包含3个外显子和2个内含子。该基因序列高度保守，编码蛋白分子量约为41.1 kD，定位于细胞质中。遗传转化结果表明，异源过表达*ApGA20ox1*可使拟南芥抽薹时间提前；通过RNAi抑制*ApGA20ox1*基因表达显著影响早花百子莲叶片GAs合成酶基因的表达和代谢流，其中*GA20ox6*、*GA3ox1*表达量显著升高，而*GA20ox1*、*GA20ox3*、*GA20ox4*和*GA2ox3*表达量显著降低，代谢产物GA_4、GA_{24}、GA_9、GA_{44}、GA_{19}和GA_{20}含量显著降低，而GA_3、GA_{51}、GA_{29}和GA_{34}含量显著升高。开花相关基因中，*FLC*家族、*SOC1*家族表达量全部显著下调；*CO*家族成员主要表现为上调；同时，*FT*及*LFY*基因的表达显著上调。【结论】*ApGA20ox1*是早花百子莲GA合成的关键基因，通过GA通路正向调控开花；RNAi沉默该基因表达可显著抑制开花基因*SOC1*表达，阻断开花通路。

关键词： 早花百子莲；*ApGA20ox1*；赤霉素；开花调控；*SOC1*；异源过表达；靶向代谢组；转录组
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0356

ApGA20ox1 Positively Regulates Flowering of *Agapanthus praecox* via the Gibberellin Metabolic Pathway

YUE Jian-hua[1, 2] FANG Ting-ting[1] CHEN Guan-qun[2] SHEN Xiao-hui[2*]
（1. *School of Horticulture, Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang* 464100; 2. *School of Design, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai* 200240）

Abstract:【Objective】To elucidate the mechanism by which *ApGA20ox1*, a key gibberellin (GA) biosynthesis gene, regulates flowering in *Agapanthus praecox*, and to provide a theoretical basis for flowering regulation and genetic improvement in this species.【Method】Total RNA was extracted from leaves of *A. praecox*, and the full-length coding sequence of *ApGA20ox1* was cloned using RACE (rapid amplification of cDNA ends). Sequence homology, subcellular localization, and prokaryotic expression were analyzed. The gene was heterologously overexpressed in *Arabidopsis thaliana*, whereas its endogenous expression was silenced in *A. praecox* via RNA interference (RNAi). Changes in GA contents and expression patterns of flowering-related genes were investigated through transcriptome sequencing and GA-targeted metabolomics.【Result】The *ApGA20ox1* gene was successfully cloned from *A. praecox*. Its full-length ORF was 1 086 bp, encoding a protein of 361 amino acids, and the genomic sequence contained three exons and two introns. The gene was evolutionarily conserved, and its encoded protein was predicted to have a molecular weight of approximately 41.1 kD and to localize in the cytoplasm. Genetic transformation assays demonstrated that heterologous overexpression of *ApGA20ox1* significantly advanced bolting time in *A. thaliana*. RNAi-mediated suppression of *ApGA20ox1* expression significantly

收稿日期： 2026-03-30
基金项目： 国家自然科学基金项目（31370695），河南省自然科学基金项目（262300421525）
*通信作者： 申晓辉 shenxh62@sjtu.edu.cn

affected the expression of GA synthase genes and metabolic flux in *A. praecox* leaves. Among these genes, the expression levels of *GA20ox6* and *GA3ox1* were significantly upregulated, whereas those of *GA20ox1*, *GA20ox3*, *GA20ox4*, and *GA2ox3* were markedly downregulated. The contents of GA_4, GA_{24}, GA_9, GA_{44}, GA_{19}, and GA_{20} decreased significantly, whereas those of GA_3, GA_{51}, GA_{29}, and GA_{34} increased remarkably. Among flowering-related genes, all members of the *FLC* and *SOC1* families were significantly downregulated, whereas most members of the *CO* family were upregulated. Additionally, the expression of *FT* and *LFY* genes was significantly upregulated.【Conclusion】*ApGA20ox1* was identified as a critical gene that regulates GA biosynthesis and positively regulates flowering through the GA pathway in *A. praecox*. RNAi-mediated silencing of *ApGA20ox1* markedly repressed the expression of the flowering integrator gene *SOC1* and blocked the flowering pathway.

Keywords: *Agapanthus praecox*; *ApGA20ox1*; gibberellin; flowering regulation; *SOC1*; heterologous overexpression; targeted metabolomics; transcriptome

早花百子莲（*Agapanthus praecox*）为百子莲科（Agapanthaceae）百子莲属多年生常绿草本植物[1]，其花型秀丽、花期持久且抗逆性强，兼具较高的观赏价值与药用潜力[2-3]。开花是被子植物生命周期中的关键事件[4]，解析其内在调控机制对于提升植物应用价值具有重要的理论与实践意义[5]。

植物的开花转变及花器官发育受遗传因素和环境信号的协同调控[6]。目前，以拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）等模式植物为研究对象，已较为系统地揭示了植物开花的多条诱导途径，包括年龄、光周期、春化、温度、赤霉素（gibberellin, GA）及糖信号等。这些途径通过信号整合，激活成花素基因*FLOWERING LOCUS T*（*FT*）和关键整合因子*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1*（*SOC1*）的表达，从而精确调控开花过程[7-11]。GA作为一种重要的植物激素，在开花诱导和花器官发育调控网络中扮演核心角色[12-13]。研究表明，GA合成或信号转导异常会直接改变植物开花时间及花器官表型[4, 11, 14]。

GA代谢通路较为复杂，目前已鉴定出136种GAs。其中，GA20氧化酶（GA20ox）是GAs生物合成途径中的关键限速酶[13, 15]，通过催化GA_{12}和GA_{53}等前体底物逐步氧化生成GA_9和GA_{20}，上述产物再进一步通过GA3ox合成具有生物活性的GAs（GA_1、GA_3、GA_4、GA_7）；同时，GA2ox可将活性GAs及其前体失活，通过GAs稳态和GA信号调控植物发育进程[4, 16-17]。研究表明，*GA20ox*的序列特征及基因功能在多种植物中较为保守[13, 16, 18]。例如，水稻（*Oryza sativa*）、小麦（*Triticum aestivum*）、葡萄（*Vitis vinifera*）和白梨（*Pyrus bretschneideri*）的多个*GA20ox*家族成员均由3个外显子和2个内含子组成[19]；在拟南芥、欧洲甜樱桃（*Prunus avium*）和水稻中，*GA20ox*均被证实正向调控开花时间[17, 20-21]。

目前，关于GA介导的开花调控研究多集中于禾本科、十字花科等模式植物[13, 22]，而在百子莲属等多年生单子叶草本植物中尚缺乏系统研究。早花百子莲作为百子莲属的优良生态型及主栽种，具有开花早、繁殖容易和适应性强等特点[23]，是解析该属植物开花调控机制的理想对象。

本研究以早花百子莲为试材，克隆获得*ApGA20ox1*基因，分析其序列特征与进化地位，明确编码蛋白的亚细胞定位。通过拟南芥异源过表达和早花百子莲内源RNA干扰（RNA interference, RNAi）遗传转化，探究该基因在开花调控中的功能；结合GA靶向代谢组与转录组数据，初步揭示*ApGA20ox1*调控早花百子莲开花的机制。旨在为早花百子莲花期调控的分子育种提供理论依据与靶标基因，同时为阐明GA介导的开花调控通路在多年生单子叶植物中的保守性与特异性提供新见解。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　植物材料　4年生早花百子莲植株栽植于上海交通大学农业与生物学院智能温室，幼叶经液氮速冻后-80 ℃冰箱保存，用于总RNA提取。早花百子莲胚性愈伤组织（embryogenic callus, EC）源自信阳农林学院园艺植物组织培养实验室，由4年生植株小花梗诱导而成，增殖保存于温度25 ℃、湿度65%的暗培养环境。本氏烟草（*Nicotiana benthamiana*）和野生型拟南芥（Col-0）种子由上海师范大学杨洪全教授惠赠。

1.1.2　载体与菌株　亚细胞定位采用Invitrogen pDONR™/Zeo Gateway系统；RNAi载体pTCK303购

自北京Biovector；pEarlyGate101-GFP、pHB载体及农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）GV3101、EHA105由杨洪全教授惠赠。大肠杆菌（*Escherichia coli*）DH5α感受态购自天根生化科技有限公司。原核表达采用pEASY-E1试剂盒，克隆菌株Trans1-T1及表达菌株*Trans*etta（DE3）购自北京全式金生物技术有限公司。

1.1.3 主要试剂 Trizol购自Invitrogen；SMARTer™ RACE cDNA扩增试剂盒购自Clontech Laboratories；RNA提取试剂盒购自上海莱枫生物科技有限公司；无核酶离心管及吸头购自Axygen公司。Poly（A）+ mRNA纯化试剂盒、EX Taq酶、Prime Script反转录酶、SYBR Prime Script RT-PCR Kit II、RNase抑制剂、pMD 18-T载体，以及限制性内切酶*Bam*H I、*Kpn* I、*Spe* I、*Sac* I、*Pst* I均购自TaKaRa公司。毒莠定（picloram, Pic）、氨苄青霉素（ampicillin, Amp）、羧苄青霉素（carbenicillin, Cb）、卡那霉素（kanamycin, Kan）、潮霉素（hygromycin, Hyg）、乙酰丁香酮（acetosyringone, AS）以及SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒购自生工生物工程（上海）股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 早花百子莲总RNA提取与cDNA合成 采用Trizol法提取RNA。取1 μg RNA反转录合成cDNA，冰浴2 min后取5 μL产物用1%琼脂糖凝胶检测。cDNA纯化后溶于三羟甲基氨基甲烷–乙二胺四乙酸（Tris-EDTA buffer, TE），-20 ℃保存备用。

1.2.2 *ApGA20ox1*基因克隆 根据转录组测序获得的序列，用Premier 5.0设计引物（附表1）。以cDNA为模板进行PCR扩增，反应体系30 μL：cDNA 2.0 μL（1.0 μg/μL），上下游引物各1.0 μL，dNTP 4.0 μL（2.5 mmol/L），EX Taq（5 U/μL）0.5 μL，10× Ex Taq buffer 2.5 μL，ddH_2O 19.0 μL。程序：94 ℃ 3 min；35个循环（94 ℃ 30 s，56 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min）；72 ℃ 5 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳回收目的片段，连接pMD 18-T载体，转化DH5α，阳性克隆测序。根据测序结果设计特异引物进行5′和3′ RACE扩增并测序。利用DNAman V6.0拼接5′、3′及保守区序列，获得cDNA全长。据此设计引物，以基因组DNA为模板PCR扩增、测序，通过序列比对确定内含子和外显子。

1.2.3 系统进化分析 利用DNAman V6.0，对NCBI数据库下载的氨基酸序列进行同源比对，并采用邻接法（neighbor-joining）构建系统进化树，自展检验重复1 000次以评估各节点的支持率。

1.2.4 原核表达载体构建与蛋白诱导表达 PCR扩增*ApGA20ox1*编码区，连接pEASY-E1载体，阳性克隆测序验证。提取重组质粒转化*Trans*etta（DE3），培养至OD_{600}=0.5–0.6时加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG）至终浓度0.5 mmol/L，37 ℃诱导3 h。收集菌体超声破碎，取蛋白样品进行12% SDS-PAGE电泳，考马斯亮蓝染色观察。

1.2.5 亚细胞定位载体构建与烟草表达 利用pDONR^{TM}/Zeo Gateway系统构建载体pDONR-*ApGA20ox1*，通过BP重组反应将其与pEarlyGate 101-GFP载体连接，获得*ApGA20ox1*-GFP融合表达载体。以空载为阴性对照，*ApGID1*为阳性对照，将重组载体转化农杆菌GV3101，培养至OD_{600}=0.6，离心收集菌体，用含2%（w/v）蔗糖的MS液体培养基重悬至OD_{600}=0.6，室温静置3 h。将GV3101与P19菌液等体积混合，选取株高10–15 cm的本氏烟草，用无针头注射器从叶片背面注入菌液至出现水渍状。培养48 h后，剪取注射区域叶片（约5 mm×5 mm），用ddH_2O封片，于Leica TCS SP5激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.2.6 拟南芥遗传转化与阳性植株筛选 选用*Bam*H I/*Pst* I位点，通过酶切连接构建pHB-*ApGA20ox1*过表达载体。拟南芥Col-0种子经消毒、无菌水冲洗后播于1/2 MS培养基，4 ℃春化72 h，幼苗长至2片真叶时移栽至蛭石∶草炭（5∶1，w/w）基质中培养。幼苗培养于人工气候室（光照16 h/黑暗8 h，光强120 μmol/（m^2·s），温度22 ℃，湿度65%）。将重组质粒转化农杆菌GV3101，阳性克隆接种于含50 mg/L Kan的YEP培养基，收集菌体并用渗透培养基重悬。当拟南芥进入盛花期时，将花序浸入菌液1 min，避光培养24 h后恢复光照。收获T_0代种子，播种后于幼苗期喷施5 000倍Basta筛选，结合Hyg抗性基因PCR检测，获得T_3代纯合株系。提取拟南芥叶片RNA，进行*ApGA20ox1*半定量检测。

1.2.7 百子莲EC遗传转化与再生 利用*Bam*H I、

Kpn Ⅰ、*Spe* Ⅰ和*Sac* Ⅰ酶切、连接，构建pTCK303-*ApGA20ox1* RNAi载体；将早花百子莲EC于含20 mg/L AS的继代培养基预培养20 d。将含重组载体的农杆菌EHA105稀释至OD_{600}=0.1，侵染EC 1 min，吸干菌液后转至共培养基（MS+1.5 mg/L Pic+20 mg/L AS+3% 蔗糖+1% 琼脂），25 ℃暗培养3 d。共培养后，EC用含400 mg/L Cb的MS液体培养基除菌5 min，吸干后转至相同成分的固体培养基恢复培养20 d。随后转至含50 mg/L Hyg的筛选培养基，每2周继代1次。以未转化EC为对照，与抗性EC同时转至成熟胚诱导培养基，获得对照与转基因株系。

1.2.8　开花表型观察与测定　2023年10月于信阳农林学院中心实验室，分别选取拟南芥野生型（Col-0）与*ApGA20ox1*过表达纯合株系各12株，观测记录其开花时间。2025年6月于信阳农林学院智慧园艺基地温室，分别选取5年生早花百子莲对照与RNAi株系，观察开花表型。

1.2.9　靶向GAs测定　供试植株GAs含量测定委托武汉迈维代谢生物科技有限公司采用LC-MS/MS平台完成。取液氮速冻的早花百子莲功能叶片0.5 g，研磨成粉，精确称量后加入内标提取液，低温涡旋、超声萃取，离心取上清液浓缩。浓缩产物复溶后经AB Sciex QTRAP® 6500+LC-MS/MS系统分析，多反应监测模式扫描，与标准品比对进行GAs定性、定量。GAs组分含量数据先进行Z-score标准化处理，后进行聚类热图分析。

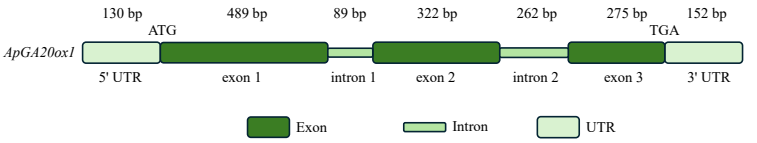
1.2.10　转录组测序　转录组测序委托武汉迈维代谢生物科技有限公司完成。取早花百子莲功能叶片0.5 g，液氮研磨后提取总RNA，经琼脂糖凝胶电泳、Nanodrop及Agilent 2100系统检测RNA纯度、浓度及完整性。使用Oligo（dT）磁珠富集mRNA，加入fragmentation buffer将mRNA打断成短片段，以其为模板合成cDNA第一链及第二链。纯化后经末端修复、加A尾和连接测序接头，PCR扩增构建文库，在Illumina NovaSeq平台进行PE150双端测序。基因表达量差异倍数大于2，P<0.05被认定为差异表达基因（differentially expressed genes, DEGs）。

1.2.11　数据处理与分析　用Excel 2016、GraphPad Prism 8、Adobe Acrobat Pro和Adobe Photoshop CS6进行数据整理和作图，用IBM SPSS Statistics 20进行显著性检验（Duncan法，P<0.05）。

2　结果

2.1　*ApGA20ox1*基因克隆与序列分析

通过RACE技术，克隆得到*ApGA20ox1*基因序列，5′ UTR和3′ UTR分别为130 bp和152 bp，通过PCR扩增得到*ApGA20ox1*基因的ORF为1 086 bp（附图1-A），与预期一致；扩增得到编码区对应DNA长度为1 437 bp（附图1-B）。*ApGA20ox1*含有3个外显子和2个内含子，外显子分别长489、322和275 bp，内含子长度分别为89和262 bp（图1）。将*ApGA20ox1*基因ORF在NCBI数据库登录，登录号为KC991045。



ATG和TGA分别为起始密码子和终止密码子

ATG and TGA are the start codon and stop codon, respectively

图1　早花百子莲*ApGA20ox1*基因外显子、内含子结构分析

Fig. 1　Analysis of exon-intron structure of *ApGA20ox1* from *A. praecox*

2.2　*ApGA20ox1*基因的系统进化分析

基于早花百子莲*ApGA20ox1*及其他11种植物*GA20ox*基因编码的氨基酸序列构建系统进化树。由图2可知，这12种植物可分为单子叶植物和双子叶植物两大分支：早花百子莲与簇毛麦（*Dasypyrum villosum*, ACU40937.1）、小麦（O04705.1）、大麦（*Hordeum vulgare*, AAT49058.1）、黑麦草（*Lolium perenne*, AAY67841.1）等单子叶植物聚为一大类，其中簇毛麦、小麦、大麦和黑麦草等禾本科植物聚在一起（支持率91%–96%），而早花百子莲与其遗传

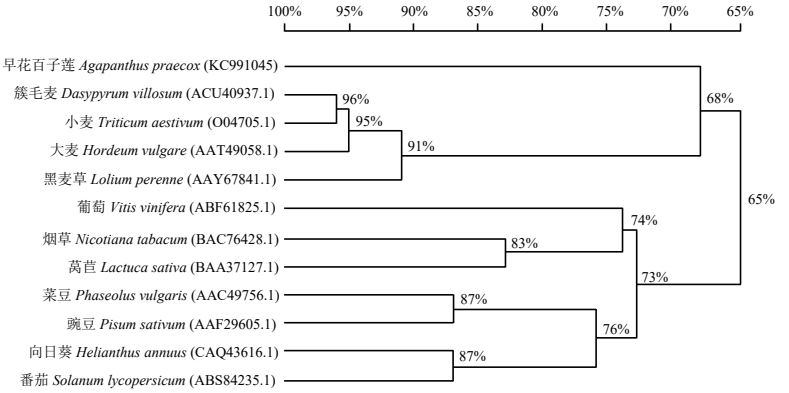


图2 早花百子莲*ApGA20ox1*基因系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of *ApGA20ox1* in *A. praecox*

距离相对较远（支持率68%）；而葡萄（ABF61825.1）、烟草（*Nicotiana tabacum*, BAC76428.1）、莴苣（*Lactuca sativa*, BAA37127.1）、菜豆（*Phaseolus vulgaris*, AAC49756.1）、豌豆（*Pisum sativum*, AAF29605.1）、向日葵（*Helianthus annuus*, CAQ43616.1）和番茄（*Solanum lycopersicum*, ABS84235.1）等双子叶植物聚为另一大类（支持率73%–87%）。

2.3 *ApGA20ox1*基因的原核表达分析

为验证目的基因的表达活性、蛋白分子量及序列真实性，将*ApGA20ox1*基因ORF连接原核表达载体，在T7启动子驱动下诱导表达，将重组载体在大肠杆菌*Trans*etta（DE3）菌株中表达，可以得到一条特异条带，大小约41.1 kD（附图2），与预测的蛋白大小一致。

2.4 ApGA20ox1蛋白的亚细胞定位分析

利用Gateway技术构建pDONR-*ApGA20ox1*入门载体，利用本氏烟草叶片进行*ApGA20ox1*瞬时表达，分析该蛋白的亚细胞定位（图3）。在*35S*::*GFP*瞬时转化的烟草叶片中，GFP信号在整个细胞中均有表达，荧光信号分布于细胞膜、细胞质以及细胞核中。以GA信号转导受体ApGID1作为阳性对照，ApGID1主要定位在细胞核，ApGA20ox1蛋白主要定位于细胞质（图3）。

2.5 过表达*ApGA20ox1*基因拟南芥的获得与表型分析

转基因拟南芥种子播种后经除草剂抗性筛选（附图3）和基因组DNA的Hyg抗性基因PCR检测

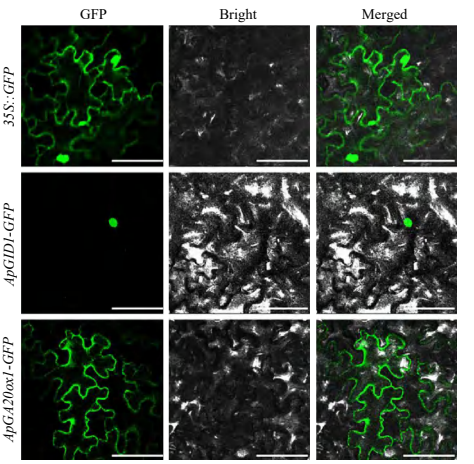


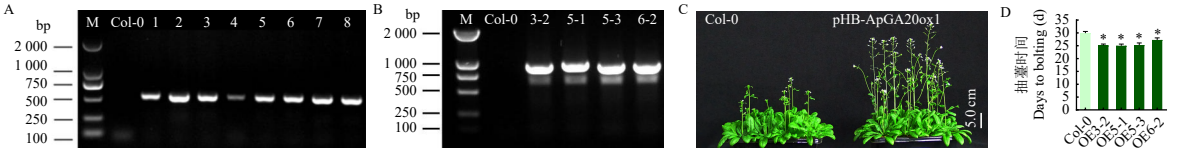
图3 ApGA20ox1蛋白在本氏烟草中的亚细胞定位（标尺100 μm）

Fig. 3 Subcellular localization of ApGA20ox1 in *N. benthamiana* (bar 100 μm)

（图4-A），确认得到多个*ApGA20ox1*基因的异源过表达株系。选择4个株系进行*ApGA20ox1*基因表达水平检测，结果表明该基因在拟南芥中能够正常表达（图4-B）。异源表达*ApGA20ox1*基因拟南芥（OE 5-1）花期提前（图4-C），4个过表达株系比Col-0分别提前4.73、4.91、4.64和2.64 d（图4-D），表明*ApGA20ox1*基因具有正向调控开花的功能。

2.6 沉默*ApGA20ox1*基因表达与开花表型分析

RNAi载体pTCK303的T-DNA结构如图5-A所示。利用*Bam*H Ⅰ和*Kpn* Ⅰ可进行*ApGA20ox1*反向片段的连接，而*Spe* Ⅰ和*Sac* Ⅰ用于*ApGA20ox1*正向片段的



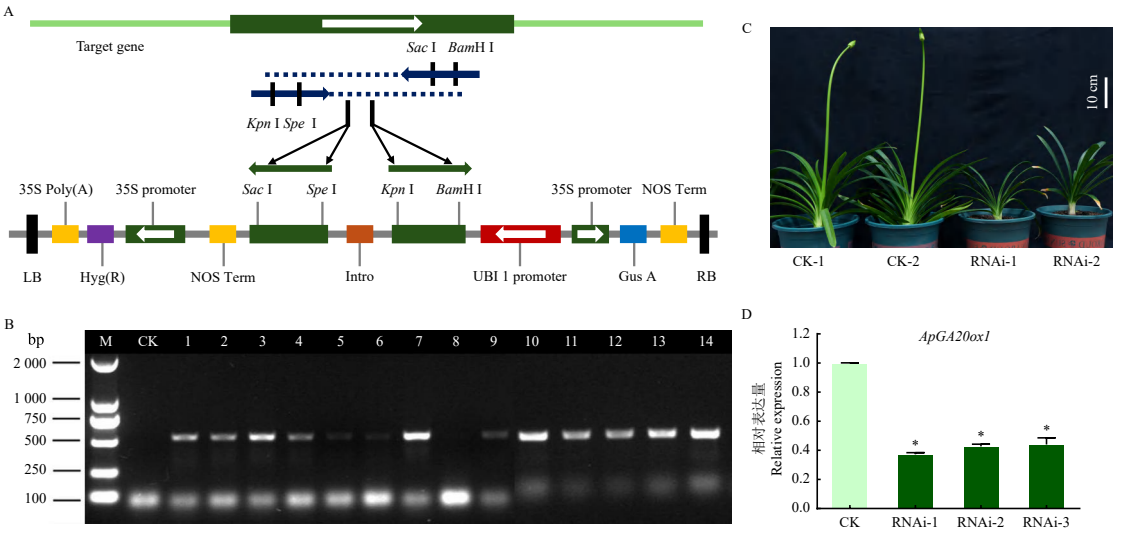
A:转基因植株DNA的PCR检测(M:DL2 000 DNA标准分子量;Col-0:野生型植株;1–8:过表达植株);B:*ApGA20ox1*在拟南芥野生型和4个株系中表达水平的检测;C:过表达*ApGA20ox1*对拟南芥开花的影响;D:过表达*ApGA20ox1*促进拟南芥抽薹的时间统计;*表示差异显著(P<0.05);下同

A: PCR detection of transgenic plant DNA (M: DL2 000 DNA marker; Col-0: wild-type plant; 1–8: overexpression lines). B: Detection of *ApGA20ox1* expression in wild-type and four overexpression lines of *A. thaliana*. C: Effect of overexpression of *ApGA20ox1* on flowering in *A. thaliana*. D: Statistical analysis of bolting time promoted by overexpression of *ApGA20ox1* in *A. thaliana*. * indicates significant differences compared with the control (P<0.05). The same below

图4　过表达*ApGA20ox1*对拟南芥开花的影响

Fig. 4　Effect of *ApGA20ox1* overexpression on flowering in *A. thaliana*

连接，以此形成发卡结构而引发目的RNA的转录后调控，抑制*ApGA20ox1*的表达。RNAi植株Hyg编码基因PCR产物大小为525 bp，而未转化植株无扩增产物(图5-B)。早花百子莲花前成熟期通常为3–4年，本研究所用对照为5年生可正常开花植株；与对照相比，RNAi株系经5年培养并没有开花，表现为无花芽分化、没有花葶抽出，表明*ApGA20ox1*具有调控早花百子莲开花诱导及花器官发育的功能（图5-C)。RT-qPCR检测表明RNAi株系中*ApGA20ox1*表达量显著下调（P<0.05)，降低幅度为55.99%–62.73%（图5-D)。



A:pTCK303-*ApGA20ox1*载体构建;B:转基因植株PCR检测(CK:野生型植株;1–14:RNAi植株);C:沉默*ApGA20ox1*对早花百子莲开花的影响;D:*ApGA20ox1*相对表达量检测

A: Construction of vector pTCK303-*ApGA20ox1*. B: PCR detection of transgenic RNAi plants (CK: wild-type plant; 1–14: RNAi lines). C: Effect of silencing of *ApGA20ox1* on flowering in *A. praecox*. D: Detection of relative expression of *ApGA20ox1*

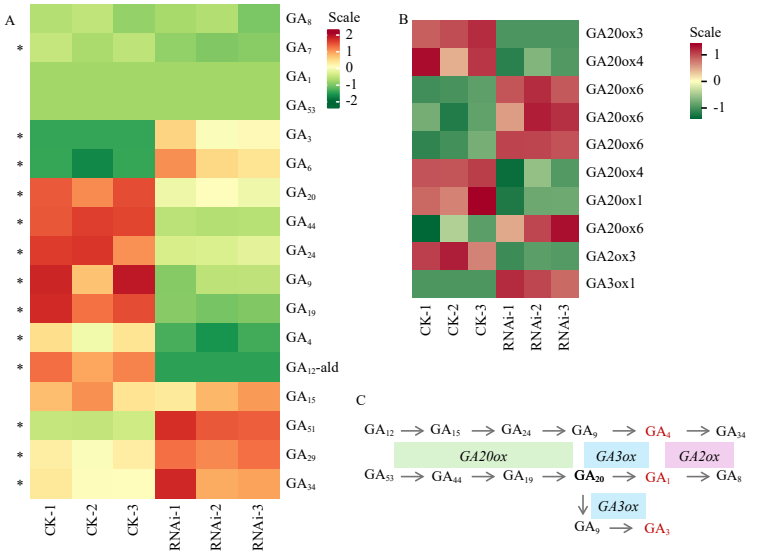
图5　沉默*ApGA20ox1*表达对早花百子莲开花的影响

Fig. 5　Effect of RNAi-mediated silencing of *ApGA20ox1* on flowering in *A. praecox*

2.7　沉默*ApGA20ox1*对早花百子莲GAs生物合成的影响

除了GA_1、GA_{53}未检测到外，CK和RNAi植株叶片中共鉴定出15种GAs（图6-A)。与CK相比，RNAi植株叶片中GA合成通路上游产物GA-12-醛（gibberellin-12-aldehyde, GA_{12}-ald)、由GA20ox直接催化合成的GA_{24}、GA_9、GA_{44}、GA_{19}和GA_{20}等中间产物含量均显著降低（P<0.05)，活性产物GA_4、GA_7含量显著

降低（P<0.05）；而GA_{51}、GA_{29}和GA_{34}以及活性产物GA_3含量显著升高（P<0.05）。GA合成酶相关DEGs如*GA20ox1*、*GA20ox3*、*GA20ox4*和*GA2ox3*的表达量显著降低，但*GA20ox6*、*GA3ox1*的表达量显著升高（P<0.05，图6-B）。结合GA合成后期通路模式图（图6-C），表明RNAi植株中*GA20ox*、*GA2ox*和*GA3ox*表达量的显著变化导致GAs代谢流的改变，进而引起活性产物GA_4含量显著降低，而GA_3含量显著升高。



A：内源GAs组分的定量分析，*表示差异显著（P<0.05），数据为RNAi vs. CK；B：GAs合成后期催化酶相关DEGs表达谱，数据为RNAi vs. CK；C：GAs合成后期模式图

A: Quantification of endogenous GAs contents. * indicates significant difference at P<0.05, data shown in the figure represent RNAi vs. CK. B: Expression profiles of DEGs encoding key catalytic enzymes in the late GA biosynthesis pathway, data shown in the figure represent RNAi vs. CK. C: Schematic diagram of the late-stage GA biosynthesis pathway

图6 沉默*ApGA20ox1*表达对早花百子莲GAs生物合成的影响

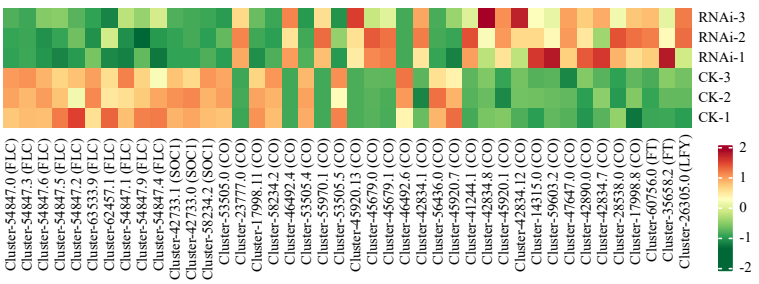
Fig. 6 Effects of silencing *ApGA20ox1* expression on GAs biosynthesis in *A. praecox*

2.8 沉默*ApGA20ox1*对早花百子莲开花相关基因表达的影响

转录组分析共鉴定出42个开花相关DEGs，其中10个*FLOWERING LOCUS C*（*FLC*）家族成员、3个*SOC1*家族成员表达量全部显著下调（P<0.05）；*CONSTANS*（*CO*）家族中8个成员显著下调、18个成员显著上调（P<0.05）；同时，2个*FT*及1个*LEAFY*（*LFY*）基因的表达显著上调（P<0.05）（图7）。

3 讨论

*GA20ox*是GAs生物合成途径的关键限速酶，通



图中数据为RNAi vs. CK

Data shown in the figure represent RNAi vs. CK

图7 沉默*ApGA20ox1*对早花百子莲开花基因表达的影响

Fig. 7 Effects of silencing *ApGA20ox1* on expression of flowering-related genes in *A. praecox*

过催化GAs前体的多步氧化反应，生成活性GAs，再通过调控GA信号通路介导植物开花[4]。本研究发现早花百子莲*ApGA20ox1*序列结构、表达模式及开花调控功能均表现出保守性，并初步解析了该基因对早花百子莲开花相关通路的调控作用。

*ApGA20ox1*外显子、内含子结构与中国白梨、油菜（*Brassica napus*）、玉米（*Zea mays*）等多个物种高度一致[19, 24-25]，编码的氨基酸序列与禾本科等单子叶植物*GA20ox*同源性较高，与禾本科等植物的遗传距离符合其作为较为古老的单子叶植物的进化地位[1-2]。ApGA20ox1蛋白主要定位于细胞质，与油菜、黄花蒿（*Artemisia annua*）等GA20ox、GA2ox定位结果一致，与活性GAs在细胞质中合成的研究结论一致[24, 26-27]。

靶向GAs代谢分析进一步明确了*ApGA20ox1*在早花百子莲GAs合成中的核心作用。研究表明，过表达*ScGA20ox*促进甘蔗（*Saccharum officinarum*）GA_3的积累[13]，而抑制香蕉（*Musa acuminata*）*MaGA20ox2*表达可导致GA_{15}、GA_{20}和活性GA_1含量下降[28]。本研究中，沉默*ApGA20ox1*导致GA20ox催化功能受阻，合成产物GA_{24}、GA_9、GA_{44}、GA_{19}和GA_{20}含量显著降低，证实ApGA20ox1酶活性被有效抑制。具有生物活性的GA_4是早花百子莲发育过程中最重要的GAs组分[29]，GA_4含量显著降低，导致GA信号通路被显著抑制。而活性GAs通常通过负反馈抑制*GA20ox*表达以维持GA稳态[26]，当其合成受阻时，植物可通过积累上游GAs来补偿；但由于关键酶缺失，GA_{29}难以被有效催化，转而进入*GA2ox*介导的失活途径，导致GA_{34}积累。该反馈激活机制与*AcGA2ox*通过降低GAs含量抑制凤梨（*Ananas comosus*）开花的研究结果一致[30]。本研究中活性GA_3含量显著升高，可能由于*GA20ox*表达受到抑制后，通过反馈调节引起*GA3ox*表达升高，通过GA_5合成补偿途径催化所导致[15]。

*GA20ox*在调控拟南芥和水稻开花中的作用具有保守性。过表达*GA20ox*可显著促进开花，而突变体或沉默株系则表现为开花延迟[21, 31]。本研究结合异源过表达、内源RNAi、GA靶向代谢与转录组分析，明确了*ApGA20ox1*是早花百子莲开花的正调控因子，其作用机制揭示了开花调控的多通路整合特征。沉默*ApGA20ox1*后，上游开花抑制因子*FLC*显著下调，表明GA合成受阻可解除对春化通路的抑制[11]。同时，*CO*基因家族表达模式复杂，暗示光周期通路被补偿性激活：当GA信号减弱时，植物通过增强*CO*表达以驱动*FT*[32]。*FT*与*LFY*的显著上调也证实了光周期通路的代偿性激活，试图绕过GA信号启动开花。在经典GA信号传导中，活性GAs与受体GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1（GID1）结合，促进DELLA降解，解除下游抑制因子，从而激活开花整合子*SOC1*[11]。*GA20ox*控制活性GA合成通量，并在长日照下诱导*FT*，进而精准调控*SOC1*表达[11]。RNAi株系中GAs合成受阻，GA信号减弱，而*SOC1*表达高度依赖于GA信号。*SOC1*是被子植物最重要的开花信号整合因子之一[33]，可以整合春化（*FLC*）、光周期（*CO*）、年龄、温度、糖类和GA诱导的开花信号；尽管补偿通路可激活*FT*、*LFY*，但GA信号受阻导致*SOC1*表达受到显著抑制，最终无法有效整合各开花信号通路，导致开花受阻[34]。此外，有研究表明GA通过调控类黄酮合成影响甜根子草（*Saccharum spontaneum*）开花[4]，通过年龄途径（*miR156-SPLs*模块）调控柑橘（*Citrus sinensis*）开花[35]；GA_4通过SOC1通路调控光周期敏感型秋菊‘神马’的开花[36]。综上所述，GA不仅是独立的开花调控通路，更是多信号通路有效整合的调节枢纽之一[31, 37-38]。

受限于供试材料的长培养周期，本研究未能如期观察到早花百子莲RNAi株系开花表型；由于RNAi植株没有抽生花葶，无法获得花器官（或茎尖）组织进行开花基因表达量的检测。后续研究可结合高通量测序数据进一步筛选下游靶标基因，深入探究GA通路与光周期、春化等开花通路的交叉调控网络，为早花百子莲开花调控的分子育种提供更充分的理论依据。

4　结论

克隆到早花百子莲*ApGA20ox1*基因cDNA全长，ORF为1 086 bp，编码一个定位于细胞质、分子量约为41.1 kD的蛋白。ApGA20ox1蛋白序列高度保守，进化地位符合单子叶植物进化特征。*ApGA20ox1*基因对早花百子莲开花不可或缺，通过控制GAs生物合成以及*SOC1*介导的开花信号整合途径正向调控开花。

文章所有附图附表请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260825100254_NewsFile_82.pdf）。

参考文献

[1] Simpson MG. Diversity and classification of flowering plants: amborellales, nymphaeales, austrobaileyales, magnoliids, monocots, and ceratophyllales [M]//Plant Systematics. Amsterdam: Elsevier, 2019: 187-284.

[2] Dong Y, Zhang YY, Zhang Y, et al. The complete chloroplast genome of *Agapanthus praecox* (Agapanthaceae), an ornamental and medicinal plant [J]. Mitochondrial DNA Part B, 2021, 6(12): 3329-3330.

[3] Dong Y, Du CM, Li PL, et al. Stage-dependent callus induction in *Agapanthus praecox*: multi-omics reveals the semi-mature pedicel explant as the optimal choice [J]. Horticulturae, 2026, 12(1): 27.

[4] Shen WL, Lin PP, Yu ZH, et al. Analysis of the *2OG-Fe (II) oxygenase* family reveals new insights associated with flowering regulation in *Saccharum spontaneum* [J]. Crop Sci, 2024, 64(1): 260-277.

[5] Wang GH, Wang JJ, Yin MR, et al. CmNLP7 interacts with CmPP6 to suppress flowering time in *Chrysanthemum* [J]. Hortic Plant J, 2025, 11(2): 865-876.

[6] Zhao B, Zhai D, Wang JW. Flowering time regulation through the lens of evolution [J]. Curr Opin Plant Biol, 2025, 85: 102734.

[7] 张长生, 魏滔, 周玉萍, 等. FLC调控植物成花的分子机制研究新进展 [J]. 植物学报, 2021, 56(6): 651-663.
Zhang CS, Wei T, Zhou YP, et al. Progress in flowering regulation mechanisms of FLC [J]. Chin Bull Bot, 2021, 56(6): 651-663.

[8] Kang DR, Dai SL, Wang ZC. MBD protein recognizes flower control genes regulated by DNA methylation in *Chrysanthemum lavandulifolium* [J]. Ornam Plant Res, 2022, 2(1): 1-14.

[9] Huang ZW, Liu GQ, Chen R, et al. The RhSPL4-RhPRR5L module positively regulates flowering time in rose (*Rosa hybrida*) [J]. Hortic Plant J, 2025, 11(5): 1930-1942.

[10] 牛钰凡, 陈玲玲, 苏晨, 等. 成花素FT: 环境感知与发育调控的信号枢纽 [J]. 植物学报, 2026, 61(1): 1-8.
Niu YF, Chen LL, Su C, et al. Florigen FT: a signaling hub connecting environmental cues and developmental regulation [J]. Chin Bull Bot, 2026, 61(1): 1-8.

[11] Izawa T. What is going on with the hormonal control of flowering in plants? [J]. Plant J, 2021, 105(2): 431-445.

[12] Feng JY, Li JG, Zhang ZM, et al. *DELLA* gene expression may be involved in chasmogamous-cleistogamous flower development and regulate the expression of B-class floral homeotic genes in *Viola philippica* [J]. Plant Physiol Biochem, 2026, 231: 111031.

[13] Wang M, Li AM, Pan YQ, et al. Gibberellin biosynthesis gene *ScGA20 oxidase* enhances sugarcane growth by modulating genes associated with phytohormone and growth processes [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 221: 109652.

[14] Wang XR, Zhang YJ, Cui CY, et al. Mitochondrial NADPH dehydrogenase B1 is involved in flowering regulation through affecting gibberellin signaling pathway in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 229: 110814.

[15] Barker R, Fernandez Garcia MN, Powers SJ, et al. Mapping sites of gibberellin biosynthesis in the *Arabidopsis* root tip [J]. New Phytol, 2021, 229(3): 1521-1534.

[16] Qin TJ, Huang Q, Li JJ, et al. Comprehensive characterization of gibberellin oxidase gene family in *Brassica napus* reveals *BnGA2ox15* involved in hormone signaling and response to drought stress [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 282: 136822.

[17] Liu XJ, Wang JY, Sun WX, et al. Sweet cherry *PavGA20ox-2* positive regulation of plant growth, flowering time, and seed germination [J]. Sci Hortic, 2023, 322: 112405.

[18] 覃悦, 杨妍, 张磊, 等. 二倍体和四倍体马铃薯*StGAox*基因鉴定与比较分析 [J]. 生物技术通报, 2025, 41(3): 146-160.
Qin Y, Yang Y, Zhang L, et al. Identification and comparative analysis of the *StGAox* genes in diploid and tetraploid potatoes [J]. Biotechnol Bull, 2025, 41(3): 146-160.

[19] Ren M, Wang Q, Zhang FH, et al. Genome-wide identification of the *GAox* gene family and functional characterization of *PbGA3ox4* during stone cell formation in Chinese white pear [J]. Sci Hortic, 2024, 330: 113063.

[20] Chen Q, Yong SY, Xu F, et al. *EjGASA6* promotes flowering and root elongation by enhancing gibberellin biosynthesis [J]. J Integr Agric, 2024, 23(5): 1568-1579.

[21] Jia XQ, Yu LY, Tang ML, et al. Pleiotropic changes revealed by *in situ* recovery of the semi-dwarf gene *sd1* in rice [J]. J Plant Physiol, 2020, 248: 153141.

[22] Kim D, Abdelaziz ME, Ntui VO, et al. Colonization by the endophyte *Piriformospora indica* leads to early flowering in *Arabidopsis thaliana* likely by triggering gibberellin biosynthesis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 490(4): 1162-1167.

[23] 陈香波, 张冬梅, 申瑞雪. 百子莲属品种资源综合评价与筛选 [J]. 上海农业学报, 2023, 39(4): 17-24.
Chen XB, Zhang DM, Shen RX. Comprehensive evaluation and suitable varieties selection of *Agapanthus* based on AHP method [J]. Acta Agric Shanghai, 2023, 39(4): 17-24.

[24] Li YH, Huang HL, Shi YM, et al. Genome-wide identification, evolution and expression analyses of *GA2ox* gene family in *Brassica napus* L [J]. Phyton, 2023, 92(3): 815-835.

[25] Qi WJ, Chang JZ, Bu HH, et al. Comprehensive analysis of *ZmGAox* gene family in maize (*Zea mays* L.) reveals novel structural features

and evolutionary patterns under positive selection [J]. Genet Resour Crop Evol, 2025, 72(8): 9683-9708.

[26] Yamaguchi S. Gibberellin metabolism and its regulation [J]. Annu Rev Plant Biol, 2008, 59: 225-251.

[27] Meng Y, Cai L, Liang DR, et al. Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the *gibberellin-20-oxidase* gene family in *Artemisia annua* L. [J]. Genet Resour Crop Evol, 2025, 72(4): 4149-4160.

[28] Zhao W, Sun XX, Wu SP, et al. *MaGA20ox2f*, an *OsSD1* homolog, regulates flowering time and fruit yield in banana [J]. Mol Breed, 2025, 45(1): 12.

[29] Yue JH, Zhang D, Chen GQ, et al. *ApGA20ox1*, a key gibberellin biosynthesis gene, regulates somatic embryogenesis and plant height in *Agapanthus praecox* [J]. Sci Hortic, 2023, 312: 111846.

[30] Cai XY, Wang YY, Wen YX, et al. Overexpression of pineapple gibberellin 2-oxidase gene *AcGA2ox6* in *Arabidopsis* induces delayed flowering, dwarfism, and enhanced leaf serration [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 229(Pt A): 110613.

[31] Bao SJ, Hua CM, Shen LS, et al. New insights into gibberellin signaling in regulating flowering in *Arabidopsis* [J]. J Integr Plant Biol, 2020, 62(1): 118-131.

[32] Zeng XL, Lv XC, Liu R, et al. Molecular basis of CONSTANS oligomerization in *FLOWERING LOCUS T* activation [J]. J Integr Plant Biol, 2022, 64(3): 731-740.

[33] Sri T, Gupta B, Tyagi S, et al. Homeologs of *Brassica SOC1*, a central regulator of flowering time, are differentially regulated due to partitioning of evolutionarily conserved transcription factor binding sites in promoters [J]. Mol Phylogenet Evol, 2020, 147: 106777.

[34] Moon J, Suh SS, Lee H, et al. The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2003, 35(5): 613-623.

[35] Chen M, Zhang TL, Zhang WB, et al. miR156-SPLs module regulates flowering and controls plant height by modulating gibberellin biosynthesis in *Citrus* [J]. Plant Biotechnol J, 2025, 23(10): 4271-4289.

[36] Zhang H, Li JY, Liu WW, et al. Diversity of gibberellins contributes to different flowering ecotypes in chrysanthemum [J]. Sci Hortic, 2024, 338: 113702.

[37] Liu P, Feng WM, Yang H, et al. Untargeted metabolomics and functional analyses reveal that the secondary metabolite quinic acid associates with *Angelica sinensis* flowering [J]. BMC Plant Biol, 2025, 25(1): 72.

[38] Nasim Z, Karim N, Ahn JH. Flowering in space: transcriptional insights into the crosstalk between aging, gibberellin, and sugar pathways to modulate flowering in space [J]. Physiol Plant, 2025, 177(4): e70460.

（责任编辑　高洁）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):196-209

黄芩*NAC*基因家族鉴定及干旱胁迫响应分析

韩美光 孙英新 郝金鹏 耿兴雨 张海航 邸鹏 杨利民 程林*
(1.吉林农业大学中药材学院 生态恢复与生态系统管理省部共建国家重点实验室培育基地,长春 130118; 2.吉林省药用植物生态种植重点实验室,长春 130118)

摘 要： 【目的】挖掘黄芩*SbNAC*基因家族成员，分析其在干旱胁迫下的表达特征，为探究NAC转录因子调控黄芩苷生物合成的分子机制奠定基础。【方法】基于黄芩的全基因组数据，采用生物信息学方法对*SbNAC*基因家族的理化性质、染色体定位、基因结构、保守基序、顺式作用元件及共线性关系进行系统分析。结合转录组数据筛选响应干旱胁迫的关键*NAC*基因，利用实时荧光定量PCR技术分析*SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*在黄芩根、茎、叶、花中的表达模式，以及干旱（5% PEG）和干旱联合脱落酸（5% PEG+100 μmol/L ABA）处理下不同时间点的表达动态。利用高效液相色谱法检测各处理下的黄芩苷含量。【结果】从黄芩基因组中共鉴定出78个*SbNAC*基因，系统进化分析将NAC蛋白分为18个分支且各分支的结构相对保守，片段重复是基因扩增的主要驱动力，顺式作用元件分析发现该家族广泛参与非生物逆境胁迫及激素信号的响应调控。干旱联合脱落酸处理可提高黄芩苷含量。根据转录组数据筛选获得3个响应干旱胁迫的候选基因*SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*，酵母单杂交结果显示这3个基因均能特异性结合CACG核心序列，PEG及PEG+ABA处理诱导*SbNAC19*和*SbNAC64*表达上调，而*SbNAC74*表达下调，揭示其可能参与调控黄芩苷的生物合成。【结论】*SbNAC*家族参与黄芩干旱胁迫及ABA信号响应过程，*SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*对黄芩苷合成具有潜在调控作用。

关键词： 黄芩；*SbNAC*基因家族；干旱胁迫；基因表达模式；酵母单杂交；黄芩苷合成；转录组；生物信息学分析
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0276

Genome-wide Identification and Drought Stress Response Analysis of the *NAC* Gene Family in *Scutellaria baicalensis*

HAN Mei-guang SUN Ying-xin HAO Jin-peng GENG Xing-yu ZHANG Hai-hang DI Peng YANG Li-min CHENG Lin*
(1. *State Key Laboratory of Ecological Restoration and Ecosystem Management Ecosystem Management, College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun* 130118; 2. *Jilin Provincial Key Laboratory of Ecological Cultivation of Medicinal Plants, Changchun* 130118)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to identify *NAC* gene family members in *Scutellaria baicalensis* Georgi and analyze their expression patterns under drought stress, providing a foundation for investigating the molecular mechanisms by which NAC transcription factors regulate baicalin biosynthesis. 【Method】 Based on *S. baicalensis* whole-genome data, bioinformatics analysis was performed to investigate physicochemical properties, chromosomal distribution, gene structure, conserved motifs, *cis*-acting elements, and collinear relationships of the *SbNAC* gene family. Combined with transcriptome data, key drought-responsive *NAC* genes were screened. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was used to analyze *SbNAC19*, *SbNAC64*, and *SbNAC74* tissue expression patterns in roots, stems, leaves, and flowers, as well as expression dynamics under polyethylene glycol 6000 (5% PEG) treatment and combined 5% PEG and abscisic acid (100 μmol/L ABA) treatment , and the baicalin content in each treatment group was determined using high-performance liquid chromatography (HPLC). Combined drought stress and abscisic acid treatment increased baicalin content. 【Result】 A total of 78 *SbNAC* genes were identified in the *S. baicalensis*

收稿日期：2026-03-10
基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（82204575），吉林省科技发展计划重点研发项目（20240305001YY）
*通信作者：程林 007105@jlau.edu.cn

genome. Phylogenetic analysis grouped the NAC proteins into 18 clades, with conserved structures observed across each clade, and segmental duplication was the major driver of gene family expansion. Analysis of *cis*-acting elements revealed that this gene family is extensively involved in regulating responses to abiotic stress and hormonal signaling. Based on transcriptomic data, three candidate genes, *SbNAC19*, *SbNAC64*, and *SbNAC74*, were identified as drought-responsive. Yeast one-hybrid assay results showed that all three proteins specifically bind to the CACG core sequence. PEG treatment and PEG-ABA combined treatment induced upregulation of *SbNAC19* and *SbNAC64* expression while downregulating *SbNAC74* expression, indicating their potential roles in baicalin biosynthesis regulation.【Conclusion】The *SbNAC* family is involved in drought stress and abscisic acid signaling in *S. baicalensis*. Furthermore, *SbNAC19*, *SbNAC64*, and *SbNAC74 m*ay play regulatory roles in baicalin biosynthesis.

Keywords: *Scutellaria baicalensis* Georgi; *SbNAC* gene family; drought stress; gene expression patterns; yeast one-hybrid assay; baicalin biosynthesis; transcriptome; bioinformatics

黄芩（*Scutellaria baicalensis* Georgi）是唇形科多年生药用植物，以干燥根入药，具有清热燥湿、止血安胎等功效[1]。在临床中黄芩常与黄连（*Coptis chinensis*）、柴胡（*Bupleurum chinense*）等药物配伍，发挥协同治疗作用[2]。黄芩中黄酮类化合物的生物合成起源于苯丙烷代谢途径，根据组织分布及产物结构差异，可分为地上部分的经典黄酮合成途径与地下根部的特异性黄酮合成途径[3]。地上部分主要合成芹菜素、野黄芩素和野黄芩苷，地下部分则主要合成黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素和汉黄芩苷[4]。随着在临床上对黄芩药用价值的不断开发，其需求量呈逐年上升的趋势。本课题组前期研究发现，干旱胁迫可改变黄芩苷的生物合成，轻度干旱可促进黄芩苷积累，提示干旱胁迫可通过调控相关转录因子激活黄酮类化合物的生物合成[5]。因此，解析干旱下转录因子调控黄芩苷生物合成途径，为阐明次生代谢途径及相应的积累规律提供理论依据。

转录因子是一类具有DNA结合结构域和转录调控结构域的调控蛋白，通过激活或抑制转录过程参与代谢通路的调控[6]。NAC转录因子家族是植物中最大的特异性转录因子家族之一[7]。NAC家族具有保守的N端NAC结构域和相对多变的C端TAR结构域。N端结构域由约150个氨基酸组成并分为5个保守的子结构域（A、B、C、D和E），负责结合DNA和其他蛋白质；C端结构域作为转录调控区，可激活或抑制转录过程[8]。Nuruzzaman等[9]研究表明，NAC蛋白C端的TRR基序在特定的NAC亚家族中具有保守性，但不同亚家族间存在差异。

NAC转录因子在植物信号转导和代谢调控中发挥重要作用，广泛参与植物器官发育[10-11]和信号转导过程[12]。1996年，Souer等[8]成功在矮牵牛（*Petunia* × *hybrida* Vilm.）中完成首个*NAC*基因*NAM*的克隆，并发现NAM决定胚胎/花器官边界与顶端分生组织形成。此外，NAC转录因子参与响应各种非生物胁迫，增强植物的抗逆性，包括对干旱[13-14]、盐度[15]、冷害[16]和高温[17]的耐受性。研究表明，将参与脱落酸依赖性信号通路应激响应的SlNAC1蛋白导入拟南芥（*Arabidopsis thaliana*），能够增强拟南芥的抗旱能力[18]。*NAC*基因还参与调控黄酮[19]、萜类[20]和生物碱[21]等次生代谢产物的生物合成。在苹果（*Malus domestica* Borkh.）中，ABA能显著诱导*MdNAC77L*表达，促进花青素积累[22]。上述研究表明，*NAC*是调控植物生长发育及胁迫应答的重要候选基因。

目前，关于NAC转录因子在黄芩干旱胁迫响应及黄酮类化合物生物合成中的调控作用尚缺乏系统研究。本研究对黄芩*SbNAC*基因家族进行系统鉴定，分析其理化性质、进化关系、基因结构、染色体定位和顺式作用元件。结合转录组数据筛选响应干旱胁迫的关键*SbNAC*基因，通过RT-qPCR分析其组织特异性表达模式及PEG、PEG+ABA处理下的表达动态，旨在揭示*SbNAC*基因在干旱胁迫响应中的潜在调控机制，为进一步解析NAC转录因子调控黄芩苷生物合成的分子机制奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

9月份从吉林农业大学药用植物园采摘2年生黄芩的花、叶、茎与根。植物材料于液氮中冷冻后，-80 ℃保存，用于黄芩RNA的提取。所有实验进行

3次生物学重复。黄芩愈伤组织由吉林农业大学药用植物园中种植的黄芩结出的种子诱导，稳定培养于人工气候箱中。

1.2 方法

1.2.1 黄芩*SbNAC*基因的鉴定及理化性质分析 黄芩的基因组数据（GWHDEDD00000000）下载自中国国家生物信息中心（https://www.cncb.ac.cn/）[23]。首先，从Pfam数据库（https://www.ebi.ac.uk/interpro/）下载NAM（PF02365）的隐马尔可夫模型，并使用HMMER3.0（http://hmmer.org/）搜索黄芩的蛋白质序列数据库进行结构域鉴定。随后，从植物转录因子数据库（http://planttfdb.gao-lab.org）下载拟南芥的NAC蛋白序列。以拟南芥的*AtNAC*基因家族序列作为参考，使用TBtools在黄芩中搜索可能的序列，阈值为1e-5，初步筛选候选*SbNAC*基因。最后，将两种方法的结果进行去冗余，并使用SMART数据库（http://smart.embl-heidelberg.de/）和Pfam数据库（https://www.ebi.ac.uk/interpro/）对去冗余后的结果进行进一步检查。此外，使用ExPASy（https://web.expasy.org/protparam/）确定黄芩NAC蛋白的物理化学特性，例如氨基酸数量（aa）、等电点（pI）和分子量（Mw）。使用WoLF PSORT（https://www.genscript.com/wolf-psort.html）对黄芩NAC蛋白进行亚细胞定位。

1.2.2 黄芩*SbNAC*基因的系统进化分析、染色体定位和共线性分析 根据MEGA对黄芩NAC和拟南芥NAC的氨基酸序列的比对结果，采用最大似然法构建1 000个自举值的系统进化树，并通过iTOL（https://itol.embl.de/）进行可视化。从黄芩的基因组注释文件中获取*SbNAC*基因的染色体位置，将其定位到9条染色体上，并绘制基因对之间的共线性关系，通过TBtools进行可视化。

1.2.3 黄芩*SbNAC*基因的结构、保守基序及顺式元件分析 从黄芩基因组注释文件获取基因结构信息，利用TBtools将所有*SbNAC*基因的结构进行图形化展示。从黄芩基因组中提取各个基因翻译起始密码子上游2 kb的基因组序列，将该2 kb区域作为启动子序列，导入PlantCARE数据库，预测可能的顺式作用元件。

1.2.4 干旱处理不同时间下黄芩苷含量测定 对黄芩愈伤组织施加5% PEG（P组）和5% PEG+100 μmol/L ABA（PA组）处理，并设置空白对照组（CK组）。分别在处理后的0、6、12、24、36、48 h取样，每次取样3个生物学重复。将0.1 g黄芩愈伤组织粉末加入3 mL 70%乙醇中，使用CEM MARS 5微波加速反应系统（CEM Corporation，美国），在90 ℃恒温下提取该混合物5 min。然后过滤样品，在进样前通过0.22 μm微孔膜过滤所得溶液。使用Agilent1100型高效液相色谱仪测得黄芩苷含量，流动相由溶剂A（甲醇）和溶剂B（0.4%磷酸）组成。梯度洗脱时间为：0–18 min，48%–65% A；18–25 min，65% A；25–26 min，65%–100% A；26–28 min，100% A。柱温恒定在25 ℃，流速1 mL/min，检测波长280 nm，进样量为10 μL。

1.2.5 黄芩*SbNAC*基因的挖掘 利用本课题组前期获得的黄芩在对照、干旱、干旱加脱落酸处理下的RNA-seq数据，进行深入挖掘。该转录组数据中共有20个差异表达的NAC转录因子，利用迈维代谢云平台（https://cloud.metware.cn）对其表达量进行Z-score归一化，绘制基因聚类热图。差异表达NAC转录因子的蛋白质互作分析基于STRING数据库（https://cn.string-db.org/）（置信度>0.7），使用迈维代谢云平台计算NAC转录因子表达量与黄芩苷含量的皮尔逊相关系数（筛选阈值$|r|>0.85$，$P<0.01$），构建NAC-黄芩苷相关性网络。筛选出核心转录因子作为关键候选调控因子，用于后续功能研究。

1.2.6 总RNA提取与cDNA合成 取黄芩根、茎、叶、花组织于液氮预冷研钵中研磨，使用北京庄盟国际生物植物总RNA快速提取试剂盒提取总RNA，使用微量核酸蛋白仪测定RNA的浓度和纯度，并通过2%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。使用TaKaRa的Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser反转录试剂盒将质量合格的RNA逆转录为cDNA，于-20 ℃保存，用于后续基因克隆和RT-qPCR检测。

1.2.7 *SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*在不同组织中的表达模式分析 利用RT-qPCR的方法，对黄芩根、茎、叶、花组织进行基因表达量分析，以*18S rRNA*为内参基因。反应体系：cDNA模板1 μL；F、R引物各1 μL；2× HyperMB Universal SYBR Green qPCR Master Mix 10 μL及ddH_2O 7 μL，总计20 μL；反应程序：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s，55 ℃退火30 s，

72 ℃延伸10 s，共40个循环。最后应用$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算各个基因在不同组织中的相对表达量（引物序列见附表1）。

1.2.8　干旱处理不同时间的*SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*基因表达分析　使用北京庄盟国际生物植物总RNA快速提取试剂盒提取样品的RNA，采用TaKaRa PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA，以*18S rRNA*作为内参基因进行定量检测。最后使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算*SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*基因在轻度干旱胁迫下的相对表达量（引物序列见附表1）。

1.2.9　*SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*基因克隆　根据转录组数据*SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*序列信息，设计特异性引物，以黄芩根cDNA为模板，进行基因序列的扩增。反应体系：cDNA模板1 μL；F、R引物各1 μL；2×TransFast® Taq PCR SuperMix（+dye）10 μL及ddH_2O 7 μL，共计20 μL；扩增程序：94 ℃预变性8 min；94 ℃变性5 s，56 ℃退火15 s，72 ℃延伸12 s，共35个循环；最后72 ℃延伸5 min。对扩增产物进行2%琼脂糖凝胶电泳，将1 000 bp左右位置条带对应的PCR产物纯化后与pEASY®-Blunt Cloning Vector载体（北京全式金）连接，构建重组质粒，并转化至Trans1-T1感受态细胞中。细胞在37 ℃、180 r/min的摇床中复苏1 h后，涂布于含卡那霉素的LB培养基，37 ℃过夜培养。挑取单菌落进行菌液PCR验证（引物M13F、M13R）阳性克隆，最终将阳性克隆送至生工生物工程（上海）股份有限公司测序（引物序列见附表1）。

1.2.10　酵母单杂交实验　对转录组中筛选出的13个编码黄芩苷合成通路关键酶的差异基因启动子区做顺式作用元件分析。*SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*的编码序列（CDS）使用含有*Xba* I和*Bam*H I限制性内切酶位点的同源臂引物进行PCR扩增（引物见附表1）。无缝克隆法将PCR产物连接到pGADT7载体中以生成重组质粒（pGADT7-SbNAC）。设计含有*Eco*R I酶切位点和3个串联核心序列CACG的引物进行PCR扩增（Core），*Eco*R I酶切将PCR产物连接到pHis2载体中。所获得的pHis2-Core+pGADT7、p53His2+p53GADT7以及pHis2-Core+pGADT7-SbNAC质粒分别转化到Y187酵母菌株中。转化后的酵母细胞培养在二缺培养基（SD/-Trp/-Leu）和三缺培养基（SD/-Trp/-Leu/-His）上。

1.2.11　数据统计与分析　试验所得数据使用Excel 2010进行整理，采用DPS数据处理系统进行方差分析和多重比较，使用迈维代谢云平台绘制基因表达热图，使用GraphPad Prism 6、Inkscape绘制图形。

2　结果

2.1　黄芩*SbNAC*基因家族的鉴定及理化性质分析

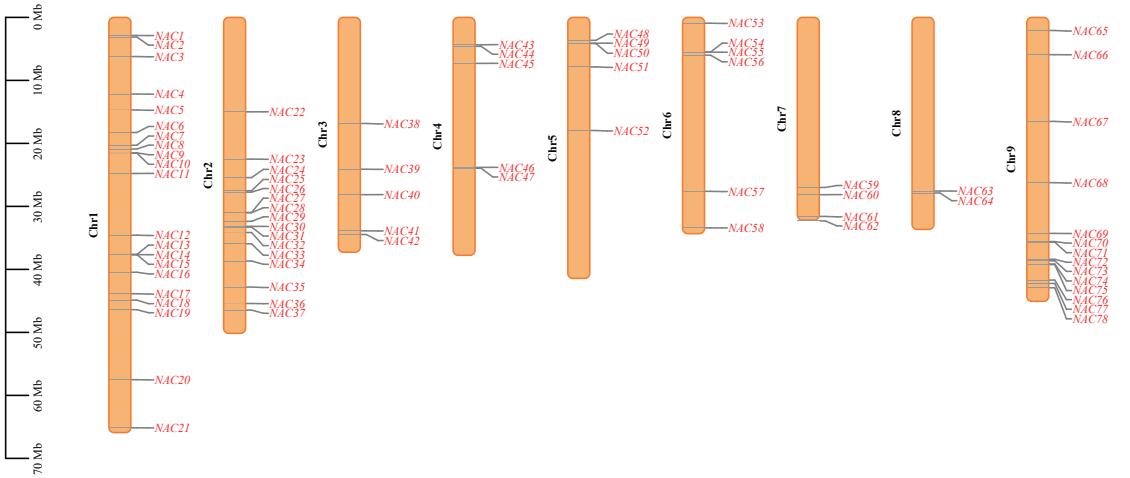
以拟南芥*AtNAC*基因的氨基酸序列为模板序列，使用包含NAM结构域的HMM模型对黄芩整个基因组的编码基因氨基酸序列数据库进行搜索。去除冗余序列后共鉴定出78个黄芩*SbNAC*基因。

根据基因在染色体位置上的分布，将78个黄芩*SbNAC*基因命名为*SbNAC1*–*SbNAC78*。理化性质分析结果显示（附表2），SbNAC蛋白的氨基酸数（aa）为130（SbNAC11）–654（SbNAC4）个，分子量（Mw）14 956.14（SbNAC11）–71 900.07 Da（SbNAC4）。78个蛋白质预测的等电点（pI）4.43（SbNAC54）–9.52（SbNAC11），平均值为6.92。其中35个SbNAC蛋白质的pI<7，为酸性蛋白质；43个SbNAC蛋白质的pI>7，为碱性蛋白质。有49个成员是不稳定蛋白，不稳定指数>40，29个成员是稳定蛋白。所有成员的脂肪族指数都>50。有70个成员亲水性值为负，表示大部分SbNAC为亲水性蛋白。亚细胞定位预测显示48个SbNAC蛋白定位于细胞核内，9个定位于叶绿体，少部分定位于过氧化物酶体、细胞骨架、细胞质和线粒体中。

2.2　黄芩*SbNAC*基因的染色体定位、基因重复及共线性分析

染色体定位结果显示（图1），黄芩*SbNAC*基因在9条染色体上呈现不均匀分布特征。1号染色体所含基因数量最多，共21个成员（26.92%）；2号染色体分布数量次之，共16个（20.51%）；3号、4号和5号染色体都含有5个成员；相比之下，8号染色体上分布的基因数量最少，仅含有2个成员。

为探究黄芩*SbNAC*基因家族的基因重复事件（图2-A），本研究对78个黄芩*SbNAC*基因进行分析。在黄芩*SbNAC*基因家族中鉴定出14个片段重复事件，而串联重复事件仅为4个，说明片段重复在黄芩*SbNAC*基因家族进化中起着重要作用。此外，为



Chr1–Chr9为1–9号染色体。左侧刻度为染色体长度(Mb),红色标注为*NAC*家族基因,引线指示基因在染色体上的具体位置

Chr1–Chr9 represent chromosomes 1 to 9, respectively. The scale on the left indicates the physical length of chromosomes in megabase pairs (Mb). Red labels denote *NAC* family genes, and the connecting lines show the specific physical positions of these genes on the corresponding chromosomes

图1 *SbNAC*基因家族的染色体定位图谱

Fig. 1 Chromosomal location map of the *SbNAC* gene family

了明确不同物种中*NAC*基因家族的系统发育关系，以拟南芥、半枝莲（*Scutellaria barbata*）和黄芩的*NAC*基因构建共线性图谱，结果显示（图2-B），黄芩与拟南芥之间有96个同源基因，黄芩与半枝莲之间有122个同源基因。

2.3 黄芩*SbNAC*基因家族的基因结构、结构域和保守基序分析

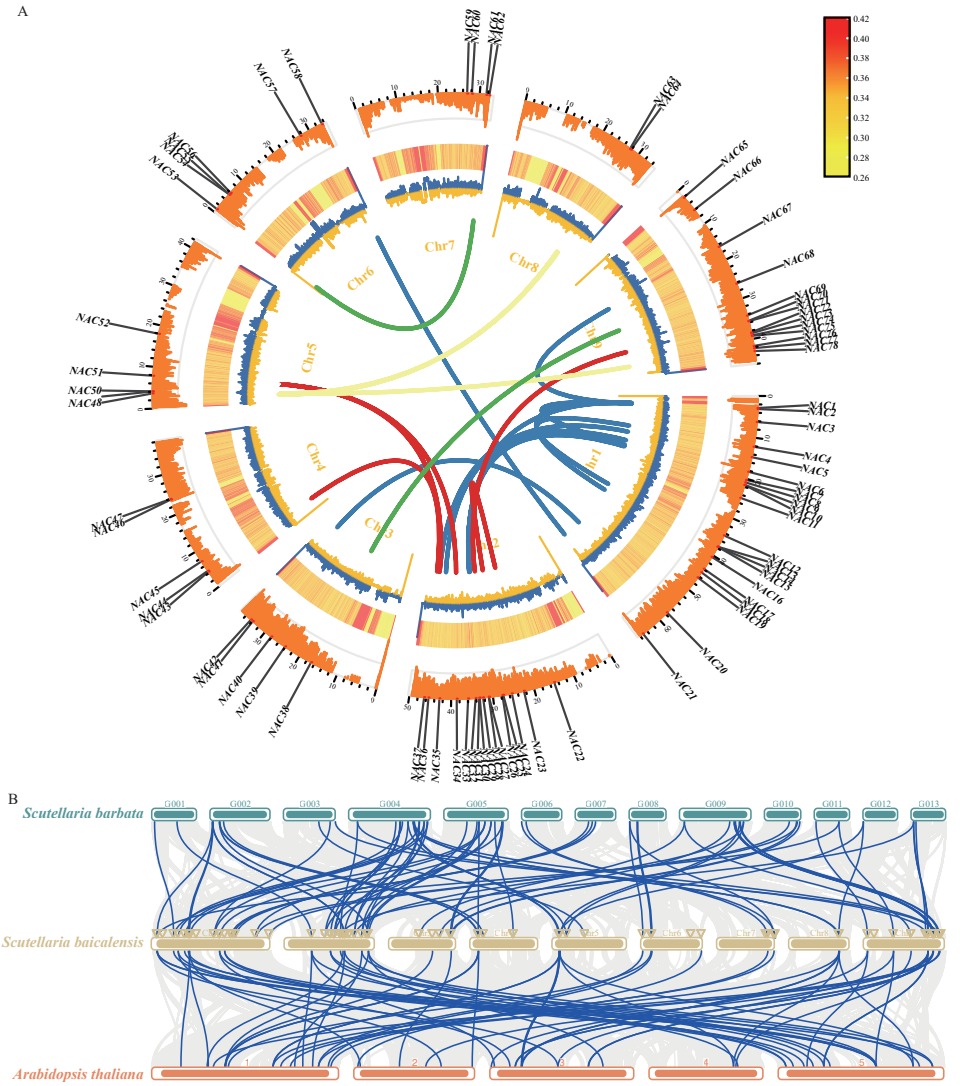
利用黄芩*SbNAC*基因构建系统进化树，根据系统进化树的拓扑顺序展示保守基序和基因结构。共鉴定出10个保守的基序（图3-A），基序1和基序2存在于所有的黄芩*SbNAC*基因中。基序1和基序5分布最为广泛，均出现在70个成员中；基序4和基序2次之，分别出现在64个和62个成员中；基序6出现的频次最少，仅出现在15个成员中；有52个成员（66.67%）都含有保守基序1–5。这有助于明确*SbNAC*基因的保守性和多样性，进一步支持系统进化树的分类。结构域分析发现，所有SbNAC蛋白均含有典型的NAM结构域，且基本上位于N端（图3-B）。基因结构分析可以进一步了解*SbNAC*基因的系统进化关系。78个*SbNAC*基因中，外显子数目2–9不等（图3-C），其中有39个成员含有3个CDS区并在两端具有完整的5′UTR和3′UTR。此外，同一分支内的成员结构组成和保守基序一般都比较相似，这再次支持了系统进化树的分类。

2.4 黄芩*SbNAC*基因家族的启动子顺式作用元件分析

对黄芩78个*SbNAC*基因启动子区域（ATG上游2 000 bp）进行顺式作用元件分析（图4），共鉴定到2 115个顺式作用元件，划分为12种功能类型，并进一步归为生长发育相关（转录因子结合位点、光响应、生长发育响应、核心启动子元件、昼夜节律相关）、激素响应相关（赤霉素响应、生长素响应）和逆境响应相关（水杨酸响应、茉莉酸响应、生物胁迫相关、非生物胁迫响应、ABA响应）3大类。总体来看，生长发育相关顺式作用元件数量最多，共1 175个，占总数的55.56%；激素响应相关元件109个，占5.15%；逆境响应相关元件460个，占21.75%。78个*SbNAC*基因中有71个成员（占91.03%）至少含有一个非生物胁迫响应元件，有60个成员含有ABA响应元件，有52个成员含有茉莉酸响应元件，有36个成员含有水杨酸响应元件，有35个成员含有生物胁迫响应元件。表明*SbNAC*基因家族可能参与非生物逆境胁迫及激素信号的响应调控。

2.5 黄芩*SbNAC*基因和拟南芥*AtNAC*基因的系统发育分析

研究表明属于同一分支的基因可能具有相似的



A：黄芩种内；B：黄芩与拟南芥、半枝莲

A: Intraspecific *S. baicalensis*. B: *S. baicalensis* versus *A. thaliana* and *S. barbata*

图2　*SbNAC*家族共线性分析

Fig. 2　*SbNAC* family collinearity analysis

功能，因此可以通过系统发育分析初步预测*SbNAC*基因的功能。通过NAC蛋白的同源性和拓扑结构将系统进化树划分为18个分支（图5）。各分支中的基因数量存在明显差异，其中*NAM*亚家族包含的成员数最多（14个*SbNAC*基因，占比17.95%），除了*ANAC001*和*UN*亚家族外，其他分支中至少聚类到一个*SbNAC*基因。

2.6　干旱胁迫下黄芩愈伤组织中黄芩苷含量测定

利用高效液相色谱法测定CK组和处理组愈伤组织中黄芩苷的含量。结果显示（图6），与CK组相比，6 h PA组（5% PEG+100 μmol/L ABA）黄芩苷含量增加了44.13%；12 h P组（5% PEG）黄芩苷含量增加了18.05%，PA组增加了48.34%；24 h PA组黄芩苷含量增加了60.37%；36 h PA组黄芩苷含量增加了7.77%；48 h PA组黄芩苷含量增加了9.82%。

2.7　干旱胁迫下黄芩苷生物合成相关NAC转录因子的挖掘与筛选

为解析干旱胁迫下黄芩苷生物合成的转录调控



A:保守基序分析,左侧为系统发育树,线条长度表示蛋白序列长度,底部标尺单位为氨基酸(aa);B:保守结构域分析,线条长度对应蛋白序列长度,底部标尺单位为氨基酸(aa);C:基因结构分析,线条长度对应基因序列长度,底部标尺单位为碱基对(bp)

A: Conserved motif analysis. The phylogenetic tree is constructed on the left. The line length indicates the protein sequence length, and the scale bar at the bottom is in amino acids (aa). B: Conserved domain analysis. The line length corresponds to the protein sequence length, and the scale bar at the bottom is in amino acids (aa). C: Gene structure analysis. The line length corresponds to the gene sequence length, and the scale bar at the bottom is in base pairs (bp)

图3 *SbNAC*基因家族的基因结构分析

Fig. 3 Gene structure analysis of the *SbNAC* gene family

机制，本研究基于课题组前期的干旱及外源ABA处理（干旱、PEG、PEG+ABA）转录组数据展开分析。在转录组中共鉴定出22个差异表达的*NAC*基因。通过迈维代谢云平台绘制其表达热图，结果显示（图7-A），18个*NAC*基因在CK组表达水平较低，在PEG或PEG+ABA处理条件下表达显著升高。其中，*SbNAC19*在PEG组和PEG+ABA组中表达均上调，*SbNAC64*在PEG+ABA组中表达上调，而*SbNAC74*在CK组中表达上调，在PEG、PEG+ABA组中表达下调。通过STRING对20个SbNAC蛋白预测互作关系（图7-B），发现SbNAC19、SbNAC64和SbNAC74在网络中与多个蛋白存在显著相关关系，位于网络的关键节点位置。对20个*SbNAC*基因和编码黄芩苷合成通路关键酶的基因构建相关性网络图发现（图7-C），*SbNAC19*对*CHI*、*FNSI*和*UBGAT*正调控，对*CHS*既有正调控又有负调控；*SbNAC64*对*PAL*、*C4H*、*F6H*和*F8H*正调控，对*CHS*和*UBGAT*既有正调控又有负调控；*SbNAC74*对*CHS*、*CHI*、*FNSI*负调控。最终筛选出*SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*作为响应干旱胁迫并潜在调控黄芩苷合成的核心候选转录因子。

2.8 *SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*在不同部位表达情况

本研究采用RT-qPCR对*SbNAC19*、*SbNAC64*和

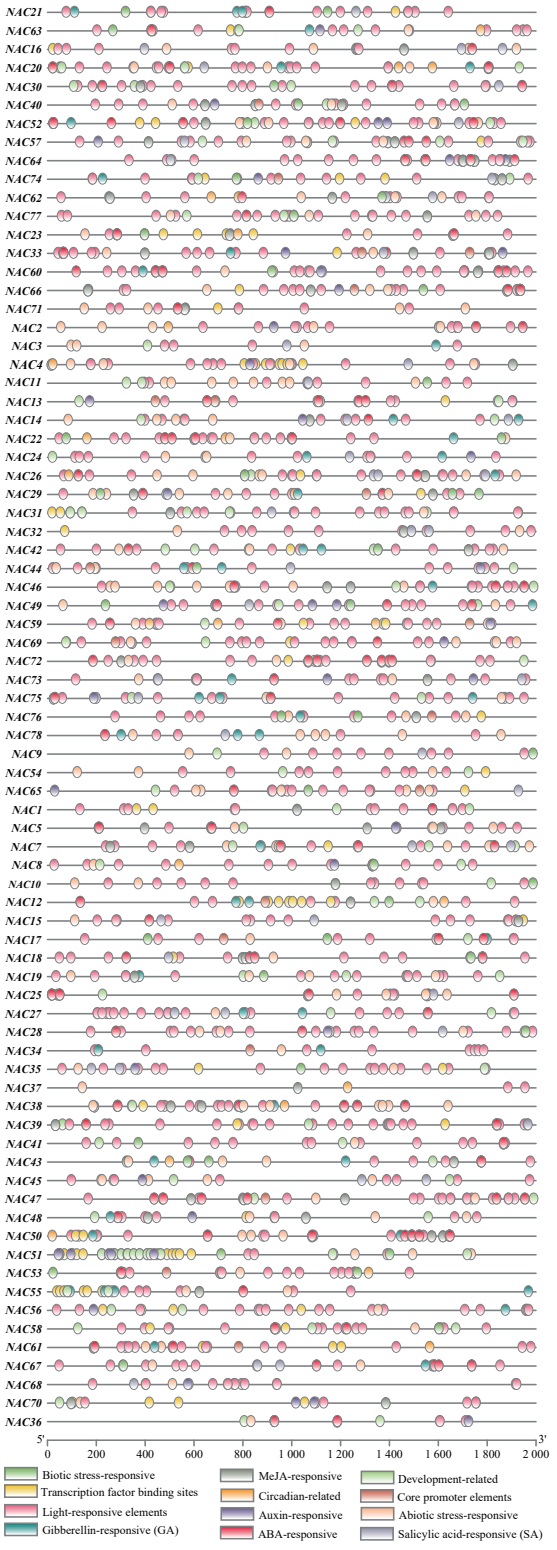


图4　*SbNAC*基因家族启动子区域顺式作用元件

Fig. 4　*Cis*-acting elements in promoter region of the *SbNAC* gene family

*SbNAC74*在根、茎、叶和花中的相对表达水平进行检测。结果表明，在不同器官中*SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*均有表达，但表达水平存在差异。*SbNAC19*在茎中表达量最高，比根和叶高8倍；*SbNAC64*在花中表达量最高，是根中表达量的27倍；*SbNAC74*在根、茎和花中表达量较平均（图8）。根据表达模式分析发现，这3个*SbNAC*基因在不同器官中的表达模式丰富，可能在黄芩生长发育过程中发挥重要调控作用。

2.9　*SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*在干旱胁迫下处理不同时间的基因表达差异

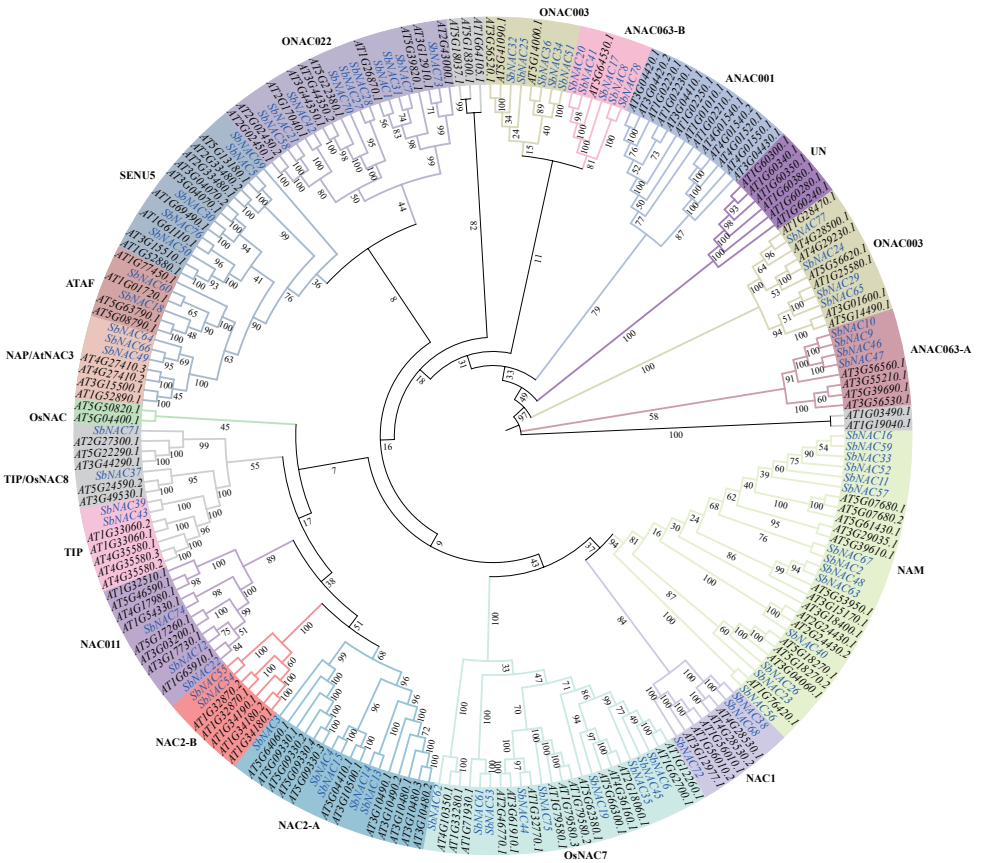
通过分析*SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*在PEG和PEG+ABA处理条件下随时间表达量的变化情况可知（图9），在CK处理下，3个基因的表达量整体变化幅度较小。PEG处理下，*SbNAC19*的表达量在6 h达到峰值（约3.15倍）；*SbNAC64*在12 h明显上调并达到峰值（约1.48倍）；*SbNAC74*的表达量则显著降低，在6 h约下降77.37%。PEG+ABA处理下，*SbNAC19*和*SbNAC64*在6–12 h表达量迅速升高（在6 h涨幅约为5.62倍和8.17倍）；而*SbNAC74*的表达量显著下调，在24 h和36 h降至较低水平，分别约下降60.39%和61.58%。总体来看，PEG+ABA处理均显著诱导*SbNAC19*和*SbNAC64*上调，持续抑制*SbNAC74*表达。

2.10　*SbNAC*的基因克隆

黄芩根cDNA扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测，在约1 000 bp处显示出单一明亮条带，与预期大小一致（附图1-A）。对阳性克隆进行菌液PCR验证，结果显示菌液样本在约1 000 bp处均有单一明亮条带（附图1-B）。测序结果表明，克隆得到的*SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*的CDS序列长度为993、960、1 038 bp，特异性条带与目的条带大小一致。

2.11　酵母单杂交分析

顺式作用元件分析显示（图10-A），13个编码黄芩苷合成通路关键酶的差异基因含有1个以上的CACG序列。在3-AT浓度筛选过程中，20 mmol/L 3-AT浓度的培养基中，pGADT7+pHis2-Core菌体生长刚好被完全抑制，选用20 mmol/L 3-AT浓度进行下一步实验。酵母单杂交实验显示（图10-B），阳性对照组p53GADT7+p53His2在二缺培养基（SD/-Trp/



采用最大似然法，分支节点数值为自展支持值（取值0–100），外圈不同颜色代表*NAC*家族的不同亚家族，进化树末端黑色字体为拟南芥*NAC*基因名称、蓝色字体为黄芩*NAC*基因名称

The maximum likelihood method was used. The values at branch nodes represent bootstrap values (ranging from 0 to 100). Different colors in the outer ring indicate different subfamilies of the *NAC* family. Gene names labeled in black at the terminals of the tree represent *NAC* genes from *A. thaliana*, while those in blue represent *NAC* genes from *S. baicalensis*

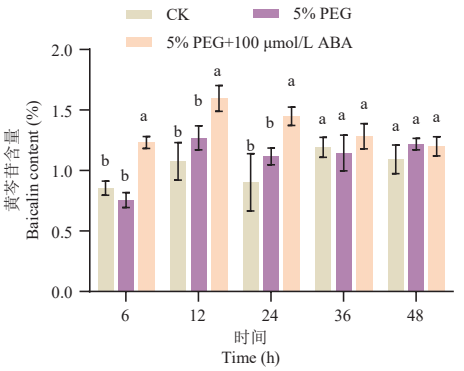
图5 黄芩和拟南芥*NAC*基因的系统发育关系

Fig. 5 Phylogenetic relationships between *S. baicalensis* and *A. thaliana NAC* genes

-Leu）和三缺培养基（SD/-Trp/-Leu/-His）上正常生长。空载体对照组pGADT7+pHis2-Core在二缺培养基（SD/-Trp/-Leu）上正常生长，在三缺培养基（SD/-Trp/-Leu/-His）上几乎没有菌落形成，证实了实验的特异性。对于SbNAC转录因子与核心基序的相互作用分析，pGADT7-*SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*+pHis-Core的共转化菌株在二缺和三缺培养基上均可生长，表明*SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*能够特异性结合CACG基序。

3 讨论

NAC转录因子家族在植物生长发育、激素信号转导及非生物胁迫响应中发挥重要调控作用[24]。本研究从黄芩基因组中共鉴定出78个黄芩*SbNAC*基因，在数量上与拟南芥[25]（105个）、穿心莲（*Andrographis paniculata*）[26]（91个）、川续断（*Dipsacus asper*）[27]（29个）、甘草（*Glycyrrhiza uralensis*）[28]（86个）、人参（*Panax ginseng*）[29]（197个）存在差异，可能与物种基因组大小、基因复制方式以及进化过程有关[30]。根据Nuruzzaman等[31]的亚家族分类方法，发现黄芩*SbNAC*在物种进化之前就已经发生了基因扩张和功能分化。保守基序及基因结构分析发现，同一分支内的不同成员可能具有共同的进化起源，参与相似的生理过程。有39个*SbNAC*成员基因结构完整，符合*NAC*基因的典型结构



柱形代表3次生物学重复的黄芩苷含量平均值(%),误差线表示标准误(SE),不同字母表示处理间在0.05水平上差异显著(P<0.05)。下同

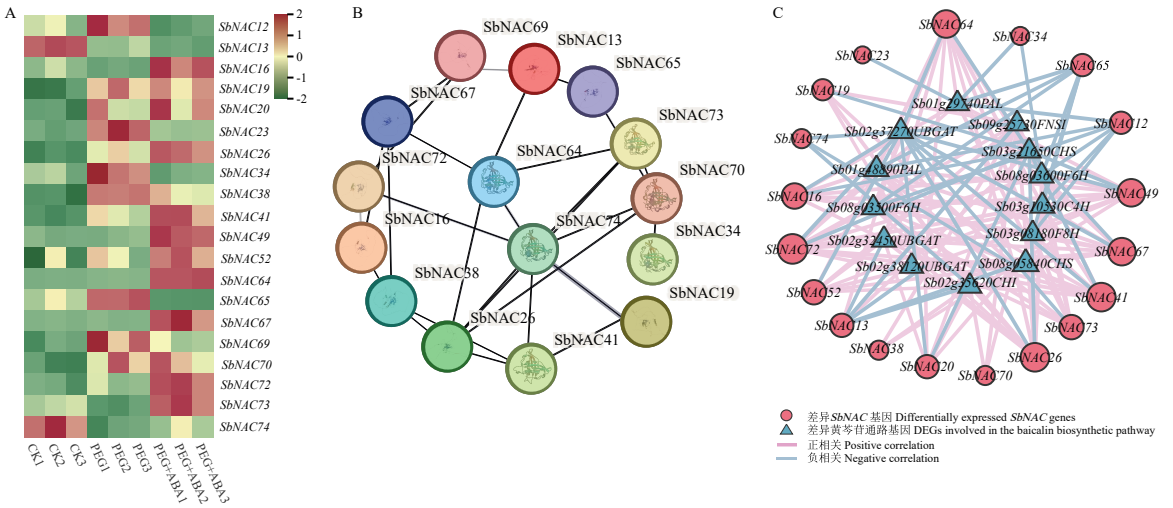
Columns represent the mean baicalin content (%) of three biological replicates. Error bars indicate standard error (SE). Different letters indicate significant differences among treatments at 0.05 level (P<0.05). The same below

图6　干旱及干旱联合ABA处理下黄芩苷含量

Fig. 6　Baicalin content under drought and drought combined with ABA treatment

特征[32]。片段重复是*SbNAC*家族扩张的主要驱动力，在其进化和环境适应中发挥重要作用，这与Du等[33]研究结论一致。共线性分析进一步明确了黄芩*SbNAC*基因家族的起源和进化，与半枝莲的同源基因在进化动力学研究中具有重要意义[34]。对78个黄芩*SbNAC*基因的顺式作用元件进行分析发现，启动子区富含生长发育、激素响应及逆境胁迫相关元件，表明该家族广泛参与逆境胁迫过程。

PEG+ABA和PEG处理下黄芩苷含量增加，*SbNAC19*和*SbNAC64*表达量显著上调，*SbNAC74*在干旱胁迫下持续下调，推测*SbNAC19*和*SbNAC64*为胁迫响应的正调控因子，*SbNAC74*作为负调控因子抑制黄芩苷合成通路基因表达，干旱信号可能通过解除其抑制从而促进黄芩苷的积累。大量研究表明NAC转录因子在植物响应干旱胁迫过程中既有正调控也有负调控。如过表达水稻（*Oryza sativa*）*OsNAC1*[35]和大豆（*Glycine max*）*GmNAC19*[36]可显著提高植株的耐受性。木瓜（*Pseudocydonia sinensis*）*CpNAC1*通过结合并激活*CP-PDS2/4*的表达，在类胡萝卜素生物合成中发挥正调控作用[37]。在干旱条件下，甘蓝（*Brassica oleracea* var. *capitata* L.）*BoNAC019*过表达可通过降低ABA含量负向调控其耐旱性[38]。组织表达分析发现，*SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*具有组织表达特异性。*SbNAC19*在茎中高表达，*SbNAC64*在花中高表达，暗示其可能在黄芩不同器官的发育及黄酮类化合物积累中发挥差异

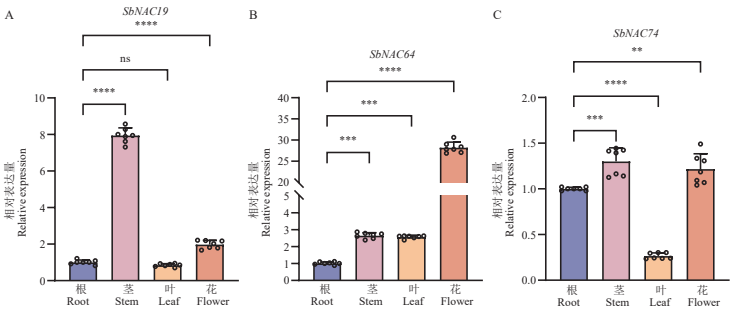


A:*SbNAC*差异基因热图;B:SbNAC差异蛋白互作网络图;C:*SbNAC*差异基因和黄芩苷合成通路关键酶差异基因相关性网络图

A: Heatmap of *SbNAC* DEGs. B: Protein interaction network diagram of SbNAC. C: Correlation network diagram between *SbNAC* DEGs and key enzymes in the baicalin synthesis pathway

图7　黄芩*NAC*差异基因与黄芩苷通路差异关键酶间的相关性分析

Fig. 7　Correlation analysis between *NAC* DEGs and key differential enzymes involved in the baicalin biosynthetic pathway in *S. baicalensis*



*, **, ***, **** 分别表示差异显著水平为*P*<0.05、*P*<0.01、*P*<0.001和*P*<0.000 1

*, **, ***, and **** indicate significant differences at *P*<0.05, *P*<0.01, *P*<0.001, and *P*<0.000 1, respectively

图8 *SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*基因组织表达特异性分析

Fig. 8 Tissue-specific expression pattern analysis of *SbNAC19*, *SbNAC64*, and *SbNAC74* genes

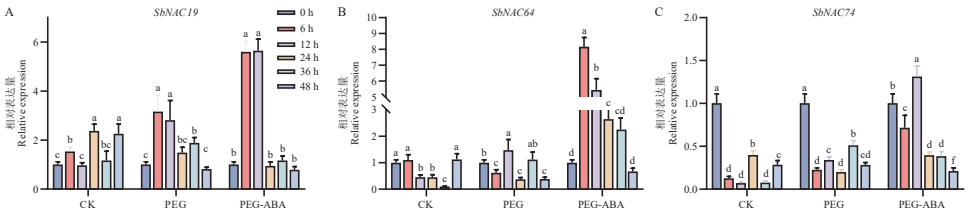


图9 不同处理下*SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*基因的表达差异

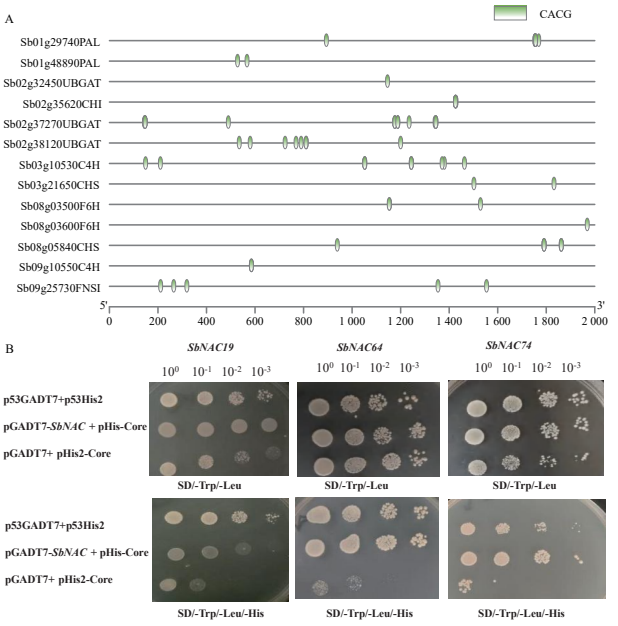
Fig. 9 Differential expression of *SbNAC19*, *SbNAC64*, and *SbNAC74* genes under different treatments

化调控作用。黄芩苷主要积累于根部，而*SbNAC74*在根中呈现相对高表达，推测其可能作为负调控因子直接调控根部黄芩苷合成。这种在生长发育及次生代谢调控中表现出明显的组织偏好性与诸多药用植物研究结论相符，如人参*PgNAC41*随人参年限增长呈明显特异性增加趋势[39]；白木香（*Aquilaria sinensis*）*AsNAC2*主要在根和茎中高表达[40]；柴胡*BcNAC*基因多在叶、花、果实中高表达[41]；丹参（*Salvia miltiorrhiza*）*SmNAC1*则在叶片中高表达，并特异性参与锌离子的转运与合成过程[42]。

顺式作用元件分析进一步支持上述推测。*SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*分别含有MBS、ABRE和TC-rich repeats元件，推测这3个基因可能通过不同信号途径参与干旱胁迫响应。类似调控模式在其他植物中已有报道，如拟南芥*AtNAC16*可直接结合*AREB1*启动子并抑制其表达，从而降低植株耐旱性[43]。小麦（*Triticum aestivum*）*TaNAC071-A*的MBS元件可直接与*TaMYBL1*结合，调控*TaNAC071-A*的表达水平及植株耐旱性[44]。CACG基序是NAC转录因子的核心结合位点[45-46]。目前已有研究证实，水稻*OsNAC103*能够与*OsCYCP2*启动子中的CACG基序结合[47]。苹果（*Malus domestica*）*MdNAC1*可以和*MdMYB10*启动子中包含CACG的核心基序结合[48]。通过酵母单杂交实验发现，*SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*可以特异性结合CACG位点，表明其可能通过结合该核心顺式元件调控下游目标基因的表达。总的来说，NAC家族成员在植物非生物胁迫响应网络中具有重要调控作用，然而转录调控机制仍需进一步解析，后续将利用凝胶迁移滞后试验（EMSA）或双荧光素酶（Dual-LUC）试验分析转录因子与合成黄芩苷关键酶基因启动子的结合关系，并结合过表达黄芩植株验证基因功能。

4 结论

鉴定出78个*SbNAC*基因，其基因结构高度保守，进化过程中以片段重复为主要扩张方式，广泛参与非生物胁迫与激素信号应答。*SbNAC19*、*SbNAC64*和*SbNAC74*具有组织表达特异性，能特异性结合CACG基序，且在干旱胁迫下黄芩苷的合成中存在复杂的联系和调控机制，推测*SbNAC19*、*Sb-*



A：编码黄芩苷合成通路关键酶的差异基因顺式作用元件分析；B：酵母单杂交实验；p53GADT7+p53His2 作为阳性对照，pGADT7-*SbNAC19*、*SbNAC64* 和 *SbNAC74*+ pHis2-Core作为实验组，pGADT7+pHis2-Core作为背景组

A: *Cis*-acting elements analysis of differential genes encoding key enzymes in the baicalin synthesis pathway. B: Yeast one-hybrid assay: p53GADT7+p53His2 as positive control; pGADT7-*SbNAC19*, *SbNAC64*, and *SbNAC74* + pHis2-Core as experimental group; pGADT7 + pHis2-Core as background group

图10　顺式作用元件分析和酵母单杂交分析

Fig. 10　*Cis*-acting element analysis and yeast one-hybrid assay

*NAC64*正向调控干旱胁迫下黄芩苷的合成，*SbNAC74*则可能发挥负向调控作用。

文章所有附图附表请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260520094254_NewsFile_54.pdf）。

参考文献

[1] Zhao Q, Yang J, Cui MY, et al. The reference genome sequence of *Scutellaria baicalensis* provides insights into the evolution of wogonin biosynthesis [J]. Mol Plant, 2019, 12(7): 935-950.

[2] 范灏奎, 李彪, 邹润, 等. 黄芩药理作用及其常用配伍药对研究进展 [J]. 现代中药研究与实践, 2025, 39(1): 91-96.
Fan HK, Li B, Zou R, et al. Research progress on pharmacological effects of *Scutellaria baicalensis* and its commonly used compatible drug pairs [J]. Res Pract Chin Med, 2025, 39(1): 91-96.

[3] Pei TL, Yan MX, Huang YB, et al. Specific flavonoids and their biosynthetic pathway in *Scutellaria baicalensis* [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 866282.

[4] Guo DD, Zhu ZY, Wang Z, et al. Multi-omics landscape to decrypt the distinct flavonoid biosynthesis of *Scutellaria baicalensis* across multiple tissues [J]. Hortic Res, 2024, 11: uhad258.

[5] Cheng L, Han M, Yang LM, et al. Changes in the physiological characteristics and baicalin biosynthesis metabolism of *Scutellaria baicalensis* Georgi under drought stress [J]. Ind Crops Prod, 2018, 122: 473-482.

[6] 于婧瑶, 巩琛锐. 植物NAC转录因子的生物学功能研究进展 [J]. 河南科学, 2024, 42(11): 1589-1601.
Yu JY, Gong CR. Advances in biological functions of plant NAC transcription factors [J]. Henan Sci, 2024, 42(11): 1589-1601.

[7] 张丹, 马玉花. NAC转录因子在植物响应非生物胁迫中的作用 [J]. 生物技术通报, 2019, 35(12): 144-151.
Zhang D, Ma YH. The role of NAC transcription factors in plant response to abiotic stress [J]. Biotechnol Bull, 2019, 35(12): 144-151.

[8] Souer E, van Houwelingen A, Kloos D, et al. The No apical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries [J]. Cell, 1996, 85(2): 159-170.

[9] Nuruzzaman M, Sharoni AM, Kikuchi S. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants [J]. Front Microbiol, 2013, 4: 248.

[10] Zheng LL, Hu YF, Yang TZ, et al. A root cap-localized NAC transcription factor controls root halotropic response to salt stress in *Arabidopsis* [J]. Nat Commun, 2024, 15: 2061.

[11] Xiong HY, He HD, Chang Y, et al. Multiple roles of NAC transcription factors in plant development and stress responses [J]. J Integr Plant Biol, 2025, 67(3): 510-538.

[12] Wen BB, Zhao XH, Gong XY, et al. The NAC transcription factor MdNAC4 positively regulates nitrogen deficiency-induced leaf senescence by enhancing ABA biosynthesis in apple [J]. Mol Horticulture, 2023, 3: 5.

[13] Mao Y, Xu J, Wang Q, et al. A natural antisense transcript acts as a negative regulator for the maize drought stress response gene *ZmNAC48* [J]. J Exp Bot, 2021, 72(7): 2790-2806.

[14] Tran CD, Rahman MM, Chu HD, et al. CaNAC67, a stress-responsive *NAC* transcription factor-encoding gene from chickpea (*Cicer arietinum*), improves drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 229: 110449.

[15] Shi WT, Ye SX, Xin YT, et al. NAC transcription factor GmNAC035 exerts a positive regulatory role in enhancing salt stress tolerance in plants [J]. Plants, 2025, 14(9): 1391.

[16] Dong YF, Tang MJ, Huang ZL, et al. The miR164a-NAM3 module confers cold tolerance by inducing ethylene production in tomato [J]. Plant J, 2022, 111(2): 440-456.

[17] Guan QM, Yue XL, Zeng HT, et al. The protein phosphatase RCF2 and its interacting partner *NAC019* are critical for heat stress-responsive gene regulation and thermotolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2014, 26(1): 438-453.

[18] Li XL, Yang X, Hu YX, et al. A novel NAC transcription factor from *Suaeda liaotungensis* K. enhanced transgenic *Arabidopsis* drought, salt, and cold stress tolerance [J]. Plant Cell Rep, 2014, 33(5): 767-778.

[19] Song SS, Ran WX, Gao LH, et al. A functional study reveals CsNAC086 regulated the biosynthesis of flavonols in *Camellia sinensis* [J]. Planta, 2024, 259(6): 147.

[20] Qu GY, Shen RB, Sun MW, et al. SmNAC68 transcription factor negatively regulate tanshinone biosynthesis under low-temperature conditions in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Plant Sci, 2026, 366: 113058.

[21] Liang XM, Qin SS, Wei GL, et al. Comprehensive analysis of the *NAC* transcription factor gene family in *Sophora tonkinensis* Gagnep [J]. BMC Plant Biol, 2025, 25: 530.

[22] Shi MY, Zhang Y, Zhang T, et al. The NAC activator, MdNAC77L, regulates anthocyanin accumulation in red flesh apple [J]. Hortic Plant J, 2025, 11(6): 2009-2023.

[23] Pei TL, Zhu SM, Liao WZ, et al. Gap-free genome assembly and *CYP450* gene family analysis reveal the biosynthesis of anthocyanins in *Scutellaria baicalensis* [J]. Hortic Res, 2023, 10(12): uhad235.

[24] 陆海芹, 李娜, 蒋凯旋, 等. NAC转录因子调控植物生长发育和胁迫应答的研究进展 [J]. 植物生理学报, 2024, 60(2): 271-283.
Lu HQ, Li N, Jiang KX, et al. Research advances on NAC transcription factors regulating plant development and stress responses [J]. Plant Physiol J, 2024, 60(2): 271-283.

[25] Ooka H. Comprehensive analysis of *NAC* family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* [J]. DNA Res, 2003, 10(6): 239-247.

[26] 徐世强, 李静宇, 孙铭阳, 等. 穿心莲*NAC*基因家族的鉴定与表达分析 [J]. 中国农学通报, 2024, 40(36): 117-125.
Xu SQ, Li JY, Sun MY, et al. Identification and expression analysis of *NAC* gene family in *Andrographis paniculate* [J]. Chin Agric Sci Bull, 2024, 40(36): 117-125.

[27] 徐娇, 胡正平, 何华, 等. 川续断*DaNAC*基因家族成员的鉴定及表达分析 [J]. 药学学报, 2021, 56(12): 3325-3330.
Xu J, Hu ZP, He H, et al. Identification and expression analysis of the *DaNAC* transcription factor family in *Dipsacus asper* [J]. Acta Pharm Sin, 2021, 56(12): 3325-3330.

[28] 刘珊, 梁玉玲. 胀果甘草中*NAC*转录因子基因鉴定及盐胁迫下差异表达分析 [J]. 分子植物育种, 2020, 18(22): 7385-7394.
Liu S, Liang YL. Identification of *NAC* transcription factors and differentially expressed genes analysis under salt stress in *Glycyrrhiza Inflata* [J]. Mol Plant Breed, 2020, 18(22): 7385-7394.

[29] 任伟超, 米要磊, 孟祥霄, 等. 人参*NAC*基因家族成员的鉴定与表达分析 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(9): 3376-3387.
Ren WC, Mi YL, Meng XX, et al. Analysis of the identification and expression of *NAC* gene family members in *Radix ginseng* [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med, 2021, 23(9): 3376-3387.

[30] Liu SQ, Guan YL, Weng YH, et al. Genome-wide identification of the *NAC* gene family and its functional analysis in *Liriodendron* [J]. BMC Plant Biol, 2023, 23: 415.

[31] Nuruzzaman M, Manimekalai R, Sharoni AM, et al. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice [J]. Gene, 2010, 465(1/2): 30-44.

[32] Kunieda T, Mitsuda N, Ohme-Takagi M, et al. NAC family proteins NARS1/NAC2 and NARS2/NAM in the outer integument regulate embryogenesis in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2008, 20(10): 2631-2642.

[33] Du ZK, You SX, Yang D, et al. Comprehensive analysis of the *NAC* transcription factor gene family in *Kandelia obovata* reveals potential members related to chilling tolerance [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 1048822.

[34] González-Torres P, Rodríguez-Mateos F, Antón J, et al. Impact of homologous recombination on the evolution of prokaryotic core genomes [J]. mBio, 2019, 10: e02494-e02418.

[35] You J, Zong W, Li XK, et al. The *SNAC1*-targeted gene *OsSRO1c* modulates stomatal closure and oxidative stress tolerance by regulating hydrogen peroxide in rice [J]. J Exp Bot, 2013, 64(2): 569-583.

[36] Cui XY, Tang MH, Li L, et al. Expression patterns and molecular mechanisms regulating drought tolerance of soybean [*Glycine max* (L.) merr.] conferred by transcription factor gene *GmNAC19* [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(4): 2396.

[37] 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.

[38] Wang JF, Lian WR, Cao YY, et al. Overexpression of *BoNAC019*, a NAC transcription factor from *Brassica oleracea*, negatively regulates the dehydration response and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. Sci Rep, 2018, 8: 13349.

[39] Liu C, Zhao MZ, Ma HD, et al. The *NAC* transcription factor *PgNAC41-2* gene involved in the regulation of ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(15): 11946.

[40] 张玉秀, 刘培卫, 吕菲菲, 等. 白木香转录因子*AsNAC2*的克隆及表达分析 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4807-4812.
Zhang YX, Liu PW, Lv FF, et al. Molecular cloning and expression characterization of a transcription factor *AsNAC2* in *Aquilaria sinensis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(15): 4807-4812.

[41] 高妍夏, 王彬彬, 谢岩, 等. 北柴胡NAC转录因子家族的分子特征与表达分析 [J]. 西北农业学报, 2026, 35(1): 117-129.
Gao YX, Wang BB, Xie Y, et al. Molecular characterization and

expression analysis of NAC family transcription factors in *Bupleurum chinense* DC [J]. Acta Agric Boreali Occidentalis Sin, 2026, 35(1): 117-129.

[42] Zhu B, Huo DA, Hong XX, et al. The *Salvia miltiorrhiza* NAC transcription factor SmNAC1 enhances zinc content in transgenic *Arabidopsis* [J]. Gene, 2019, 688: 54-61.

[43] Sakuraba Y, Kim YS, Han SH, et al. The *Arabidopsis* transcription factor NAC016 promotes drought stress responses by repressing *AREB1* transcription through a trifurcate feed-forward regulatory loop involving NAP [J]. Plant Cell, 2015, 27(6): 1771-1787.

[44] Mao HD, Li SM, Chen B, et al. Variation in *cis*-regulation of a NAC transcription factor contributes to drought tolerance in wheat [J]. Mol Plant, 2022, 15(2): 276-292.

[45] Tang WJ, Ye J, Yao XM, et al. Genome-wide associated study identifies NAC42-activated nitrate transporter conferring high nitrogen use efficiency in rice [J]. Nat Commun, 2019, 10: 5279.

[46] Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, et al. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse [J]. Trends Plant Sci, 2005, 10(2): 79-87.

[47] Li Y, Zhao LM, Guo CM, et al. OsNAC103, an NAC transcription factor negatively regulates plant height in rice [J]. Planta, 2024, 259(2): 35.

[48] Liu WJ, Mei ZX, Yu L, et al. The ABA-induced NAC transcription factor MdNAC1 interacts with a bZIP-type transcription factor to promote anthocyanin synthesis in red-fleshed apples [J]. Hortic Res, 2023, 10(5): uhad049.

（责任编辑　高洁）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):210-221

转录组和代谢组联合分析蒙古黄芪茎表皮毛形成及其对药效成分积累的影响

雷子莹[1] 武延慧[1] 赵生婷[1] 张瑜[1] 王嘉蕾[1] 贺润丽[1*] 刘建霞[2] 王瑞军[3]
（1.山西中医药大学中药与食品工程学院，晋中 030619；2.山西大同大学，大同 037009；3.山西农业大学高寒区作物研究所，大同 037008）

摘 要： 【目的】筛选蒙古黄芪茎表皮毛形成关键基因，探究茎表皮毛对黄酮和皂苷类药效成分的影响。【方法】通过扫描电子显微镜（SEM）观察蒙古黄芪多毛茎与无毛茎表型特征，转录组（RNA-seq）和非靶向代谢组（UPLC-MS/MS）技术分析茎表皮毛形成机制及代谢物积累变化；高效液相色谱（HPLC）探究2种表型对茎和根部主要药效成分积累的影响。【结果】蒙古黄芪茎表皮毛为非腺毛，转录组共筛选出15 917个差异表达基因（DEGs），这些DEGs涉及表皮毛发育、植物激素信号转导及类黄酮生物合成等通路，其中与表皮毛发育相关的基因*GIS*、*GIS3-like*、*GIS3*、*HAT1*和*ETC1*可能较高程度参与非腺毛的形成。代谢组学共检测到670个差异积累代谢物（DAMs）。与多毛茎相比，无毛茎中443个代谢物上调、227个下调，DAMs主要富集于苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、核苷酸代谢通路等。HPLC分析表明，无毛茎蒙古黄芪茎部毛蕊异黄酮苷含量极显著低于多毛茎茎部（$P<0.01$），芒柄花素含量显著高于多毛茎茎部（$P<0.05$）；无毛茎根部毛蕊异黄酮含量（$P<0.05$）、4种皂苷类成分总含量（$P<0.05$）均显著低于多毛茎根部。【结论】筛选出多个调控蒙古黄芪茎表皮毛的候选基因。蒙古黄芪茎表皮毛与异黄酮类和皂苷类药效成分积累存在一定关联，多毛茎较无毛茎表型更优。

关键词： 蒙古黄芪；代谢组；转录组；非腺毛；黄酮类；皂苷类
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0172

Integrated Transcriptomic and Metabolomic Analysis Reveals the Mechanism Underlying Trichome Formation on the Stem Epidermis of *A. mongholicus* and Its Impact on Bioactive Compound Accumulation

LEI Zi-ying[1] WU Yan-hui[1] ZHAO Sheng-ting[1] ZHANG Yu[1] WANG Jia-lei[1] HE Run-li[1*] LIU Jian-xia[2] WANG Rui-jun[3]
(1. *College of Chinese Materia Medica and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong* 030619; 2. *Shanxi Datong University, Datong* 037009; 3. *Institute of Crops in Frigid Regions, Shanxi Agricultural University, Datong* 037008)

Abstract: 【Objective】This study aimed to identify key genes regulating stem trichome formation in *Astragalus mongholicus* and to investigate how pilose and glabrous stems affect the accumulation of flavonoids and saponins.【Method】Phenotypic characteristics of glabrous and pilose stems were examined using scanning electron microscopy (SEM). An integrated approach combining transcriptome sequencing (RNA-seq) and untargeted metabolomics (UPLC-MS/MS) was employed to elucidate the regulatory mechanism of trichome formation and associated metabolic changes. Furthermore, high-performance liquid chromatography (HPLC) was employed to analyze the effects of these two phenotypes on the accumulation of major bioactive compounds in both stems and roots.【Result】SEM revealed that the stem epidermal trichomes of *A. mongholicus* are non-glandular trichomes. RNA-seq analysis identified 15 917 differentially expressed genes (DEGs), which

收稿日期：2026-02-04
基金项目：中医药科技创新工程项目（2024kjzy009），山西地道药材旅游资源普查（2025PY-CXY-002），大同市重点（农业）研发项目（2025019），山西省中医药管理局项目（2022ZYYC101，2022ZYYC255），山西中医药大学科技创新能力培育项目（2022PY-TH-19，2022PY-TH-20），山西省科学技术厅山西省科技创新人才团队项目（202304051001020）
*通信作者：贺润丽 herunli@sxtcm.edu.cn

were significantly enriched in the pathways related to trichome development, plant hormone signal transduction, and flavonoid biosynthesis. Among them, the trichome development-related genes *GIS*, *GIS3-like*, *GIS3*, *HAT1* and *ETC1* may be highly involved in the formation of non-glandular trichomes. Metabolomics profiling revealed 670 differentially accumulated metabolites (DAMs) in the epidermis of glabrous stems using the pilose stem epidermis as a control, among which 443 metabolites were up-regulated and 227 were down-regulated. The DAMs are mainly enriched in the biosynthetic pathways of phenylalanine, tyrosine and tryptophan, as well as nucleotide metabolism pathways. HPLC quantification confirmed a significant decrease (P<0.01) in the content of calycosin-7-O-β-D-glucoside in glabrous stems. In the roots of glabrous plants, the contents of calycosin and total content of the four saponin components were significantly reduced (P<0.05). 【Conclusions】 Several candidate genes regulating stem trichome formation in *A. mongholicus* were screened out. The stem trichomes of *A. mongholicus* are closely associated with the accumulation of bioactive ingredients including isoflavonoids and saponins. The pilose stem phenotype exhibits better agronomic performance than the glabrous stem phenotype.

Keywords: *Astragalus mongholicus*; metabolomics; transcriptomics; non-glandular trichomes; flavonoids; saponins

黄芪为豆科植物蒙古黄芪（*Astragalus membranaceus*（Fisch.）Bge. var. *mongholicus*（Bge.）Hsiao）或膜荚黄芪（*Astragalus membranaceus*（Fisch.）Bunge）的干燥根，具有补气升阳、固表止汗、利水消肿等功效[1]。现代药理学研究表明，黄芪主要药效物质为黄酮类（毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素）和皂苷类（黄芪甲苷、黄芪皂苷I–III）[2–3]。蒙古黄芪是目前市场的主流品种，受生物、非生物胁迫及内在遗传因素等影响，蒙古黄芪茎部形成了多毛与无毛2种自然表型，其中大多数茎覆盖毛茸，少部分茎为无毛。茎作为植物地上部分的重要营养器官，对连接植株根和叶、运输营养物质起着重要作用。通过系统研究茎部表型特征，可全面评估茎部发育状况，进而推断其对根系生长的影响。目前，茎表皮毛与药效成分之间的关联尚不明确，尤其是表皮毛缺失是否通过调控代谢通路影响药效成分含量，仍有待深入研究。

植物的表皮和附属结构是应对外界环境的首要防线，在抵御生物和非生物胁迫中发挥重要作用[4]。毛状体由表皮细胞分化而来，根据是否有腺体可分为腺毛和非腺毛[5]。腺毛能够合成、储存并分泌多类次生代谢物，而非腺毛则不具分泌功能[6]。研究表明非腺毛具有防御功能，还参与温度调节、水分蒸散和重金属解毒等过程[7–8]。此外，一些研究也表明拟南芥毛状体[9]、青蒿栽培品的非腺毛[10]和成熟橄榄的非腺毛[11]具有活跃的次级代谢能力。

非腺毛由单细胞或多细胞构成。单细胞非腺毛的研究主要集中于模式植物拟南芥，其发育过程包括核内复制、细胞快速伸长及分枝形态建成等阶段[12]。相比之下，多细胞非腺毛的形态更为多样，包括线状、分支状和星状等，常见于番茄、棉花等重要经济作物中，但其核心调控网络相较于单细胞非腺毛更为复杂[13]。植物激素被认为是诱导毛状体发生的关键信号[14]。经典理论认为，由无毛基因1（*GL1*）、无毛基因3（*GL3*）和透明种皮无毛基因1（*TTG1*）构成的MYB-bHLH-WD40（MBW）三蛋白复合物通过调控下游转录因子无毛基因2（*GL2*）表达启动毛状体形成，而R2 MYB类蛋白（如*CPC*、*TRY*）通过竞争性抑制MBW复合体的活性，形成“激活–抑制”调控网络[15]。此外，也有研究表明，表观遗传修饰与染色质重塑也参与毛状体发育调控，为其分子机制研究提供了新的视角[16]。

基于此，本研究以5年生蒙古黄芪为材料，利用扫描电子显微镜（SEM）观察茎表皮毛形态特征；基于转录组和代谢组测序分析茎表皮毛形成机制及揭示代谢响应特征，最后通过高效液相色谱（HPLC）探究茎表皮毛是否会对主要药效成分产生影响，为蒙古黄芪药材品质评价及分子育种研究提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

冷场扫描电子显微镜（日立SU8010，日立科学仪器有限公司），光学显微镜（BMC100，凤凰光学有限公司），电子分析天平（XSR105DU，梅特勒托利多科技有限公司），高效液相色谱仪（LC-2050C，岛津企业管理有限公司），高效液相色谱仪（Waters

e2695，美国沃特世公司），质谱仪（TripleTOF 6600+，SCIEX），荧光定量PCR仪（LightCycler480 II；Roche）。

对照品毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素（批号230916、230817、230509、230708）、黄芪皂苷I-IV（批号241029、224110、341030、C10735032）均购自上海融禾医药科技发展有限公司；多糖多酚植物总RNA提取试剂盒（批号DP772）购自天根生化科技有限公司。

蒙古黄芪样品于2024年7月10日采自山西省大同市浑源县官儿乡木沟村仿野生种植基地（113°63′E，39°56′N），所有样本均经山西中医药大学中药与食品工程学院刘计权教授鉴定为蒙古黄芪（附图1）。基于前期调研筛选并标记长势一致的多毛和无毛表型黄芪各10株，对其进行茎表皮毛茸观察和HPLC定量分析。随后从2组中各选取3株，用超纯水冲洗表面杂质后，剥取距地面5 cm处主干茎表皮组织（表皮和皮层）约0.5 g用于转录组测序；同时采集同等茎表皮组织约1 g用于非靶向代谢组分析。所有样品经液氮速冻后，通过干冰运输并保存于-80 ℃冰箱。转录组和代谢组测序材料多毛茎表皮编号为PS，无毛茎表皮为GS。HPLC检测用茎部和根部整体组织，多毛茎茎部编号为PHS，无毛茎茎部为GHS，多毛茎根部为PHR，无毛茎根部为GHR。

1.2 方法

1.2.1 茎表皮毛观察及根部年限鉴定 取采集的茎样本，蒸馏水冲洗表面灰尘杂质，用刀片切下约5 mm×5 mm茎表皮，于自然环境下晾干，将晾干的样品置于导电胶上，使用SEM观察毛茸形态并拍照。根部样本年限鉴定参考文献方法[17]，切除根部芦头部分，采用徒手切片法制备横切面薄片，将薄片置于载玻片上滴加间苯三酚-浓盐酸染色液染色，在光学显微镜下观察，结合年轮数量及当地种植经验确定植株年限。

1.2.2 转录组测序 使用试剂盒提取蒙古黄芪的茎表皮总RNA，并检测RNA完整性。经质量验证合格后，构建适用于Illumina HiSeq™平台的测序文库。测序下机后的原始数据经过质量控制，随后通过从头组装获得Unigene序列。将Unigene比对至非冗余的核酸序列数据库（NT）、保守结构域数据库（CDD）、人工注释和校验的蛋白质序列数据库（Swiss-Prot）、基因本体数据库（GO）、京都基因与基因组百科全书（KEGG）非冗余的蛋白质序列数据库（NR）和蛋白质家族数据库（PFAM）（设定显著性阈值$E<1\times10^{-5}$），基于序列相似性进行基因功能注释与分类。采用每百万转录本计数法（TPM）对Unigene表达量进行标准化，通过DESeq软件开展组间差异表达分析，以$q<0.05$且差异倍数$|\log_2FC|\geq1$为阈值筛选差异表达基因（DEGs）。对筛选得到的DEGs进一步进行GO功能注释和KEGG通路富集分析，探究其潜在生物学功能及参与的代谢通路。

1.2.3 实时荧光定量PCR分析 使用RNA提取试剂盒提取茎表皮样品RNA，经电泳检测基因组污染合格后，将RNA反转录合成cDNA，稀释5倍作为模板进行实时荧光定量PCR（RT-qPCR）分析。RT-qPCR条件：95 ℃预变性3 min；随后45个循环扩增（95 ℃ 15 s，60 ℃ 45 s）。每个样品设3个技术重复，以*18S rRNA*为内参基因，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目标基因相对表达量。

1.2.4 非靶向代谢组分析 黄芪茎表皮样本经真空冷冻干燥63 h后，研成粉末。称取30 mg粉末，加入1 500 μL -20 ℃预冷的70%甲醇水溶液（含2-氯-苯丙氨酸内标），每30 min涡旋30 s，共6次，12 000 r/min离心3 min，上清经0.22 μm滤膜过滤后用于超高效液相色谱-串联质谱法（UPLC-MS）分析。使用Waters ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱，以含0.1%甲酸的水/乙腈为流动相，40 ℃柱温、0.40 mL/min流速、4 μL进样量，正负离子模式检测。数据与上海生工股份有限公司实验室自建数据库、整合公共库、预测库以及metDNA方法进行代谢物鉴定，筛选综合打分≥0.5且QC样本CV<0.5的代谢物，经R软件主成分分析（PCA）、正交偏最小二乘法判别分析（OPLS-DA）分析后，以|Fold change|≥2或≤0.5、VIP>1筛选差异积累代谢物（DAMs），并进行KEGG通路映射分析。

1.2.5 黄酮及皂苷成分定量分析 对照品溶液制备：精密称取对照品毛蕊异黄酮苷9.95 mg、芒柄花苷3.84 mg、毛蕊异黄酮2.28 mg，芒柄花素930 μg，黄芪甲苷3.30 mg、黄芪皂苷I 9.40 mg、黄芪皂苷II 4.80 mg和黄芪皂苷III 3.88 mg，用甲醇溶解并定容。

分别吸取适量上清液，制成混合对照品溶液。

供试品溶液制备：将采集的黄芪茎部和根部样本洗净、置于通风处阴干，分别标记、打粉，过60目筛。制备方法参考文献进行改进[17]，取供试品粉末约1.00 g，加入50 mL甲醇，80 ℃加热回流3 h。滤过、浓缩，溶解至5 mL容量瓶中。

黄酮液相色谱条件：Diamonsil C_{18}色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相分别为乙腈（A）和0.1%磷酸水（B）；梯度洗脱0–10 min，15%–20% A；10–25 min，20%–30% A；25–31 min，30% A；31–45 min，30%–60% A；45–50 min，60%–85% A；50–55 min，85%–15% A。流速1.0 mL/min，检测波长217 nm；柱温30 ℃；进样体积10 μL。

皂苷液相色谱条件：流动相分别为乙腈（A）和水（B）；色谱方法参考文献[18]，并在此基础上进行修改。梯度洗脱0–8 min，30%–41% A；8–12 min，41%–45% A；12–14 min，45% A；14–16 min，45%–50% A；16–19 min，50%–60% A；19–24 min，60%–30% A；24–29 min，30% A。流速1.0 mL/min，柱温30 ℃；进样体积10 μL；漂移管温度95 ℃；氮气流速3.0 L/min。

方法学考察：精密吸取混合对照品溶液，平行进样6次，对仪器精密度进行考察；称取1份样品，制备供试品溶液1份，分别在0、2、4、8、12、24 h进样，进行样品稳定性考察；称取6份同一样品，制备6份供试品溶液，进行重复性考察；称取6份已知化合物含量的同一样品，分别加入适量的对照品后，制备样品溶液，检测并计算加样回收率。

线性考察：将配制好的对照品溶液分别逐级稀释，过0.2 μm滤膜后，进样10 μL，计算回归方程。

1.2.6　数据处理　数据采用Excel 2021软件整理，GraphPad Prism软件作图，SPSS 20.0软件进行显著性分析，使用独立样本t检验进行显著性分析，结果用$\bar{x}\pm s$表示。

2　结果

2.1　茎表皮毛观察及根部年限鉴定结果

SEM结果显示（附图2），蒙古黄芪茎表皮毛主要为非腺毛，非腺毛表面具均匀分布的乳状凸起；无毛茎表皮光滑，具有较多形态完整的气孔。根生长轮是维管形成层季节性活动，在次生木质部位由早材（大导管群）和晚材（小导管群）交替排列形成的同心环状结构。光学显微镜观察结果表明，蒙古黄芪根部样本均具有次生木质部年轮结构（附图3）。通过计数根部年轮数量结合当地种植周期，最终确定全部样本均为5年生样本。

2.2　转录组测序结果

2.2.1　转录组测序、组装　测序结果显示（附表1），蒙古黄芪多毛茎表皮（PS）共获得数据量21.04 Gb，无毛茎表皮（GS）共获得21.61 Gb，经过质量控制后，分别获得19.51 Gb和19.84 Gb。数据质量评估表明，所有样本Q20值均>99%，Q30值均>96%，GC含量均>44%，满足后续测序要求。使用Trinity将clean data *de novo*组装成转录本，共获得308 092条转录本，对组装得到的转录本去冗余聚类后得到147 954条Unigene。将Unigene比对至NT、CDD、Swiss-Prot、GO、KEGG、NR、PFAM等公共数据库，分别获得注释数目为57 214（38.67%）、28 388（19.19%）、59 836（40.44%）、47 454（32.07%）、26 630（18%）、80 828（54.63%）、35 210（23.8%）。

2.2.2　DEGs鉴定　PCA得分图显示PS和GS两组间样本主要由主成分PC1（64.92%）解释且两组间样本分离度良好（图1-A）。根据转录测序结果，以q value<0.05且差异倍数|$\log_2$FC|≥1为阈值，筛选DEGs，共筛到15 917个，与PS相比，GS中上调10 338个，下调5 579个（图1-B）。

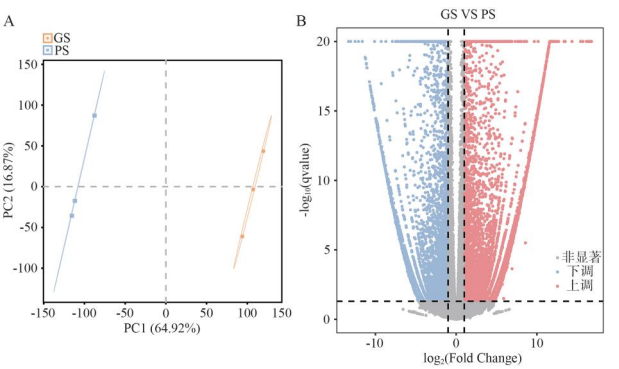
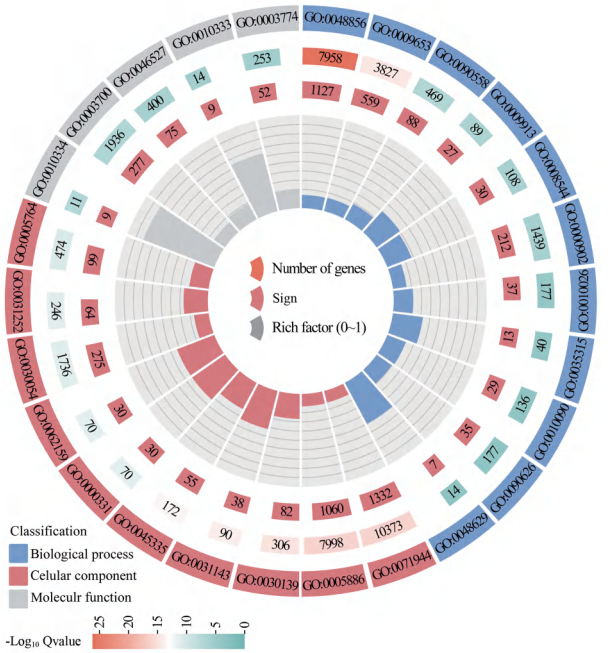


图1　PCA得分图（A）和DEGs火山图（B）

Fig. 1　PCA scoring plot (A) and volcano plot of DEGs (B)

2.2.3　GO富集分析　GO富集结果显示（图2），DEGs共富集到677个GO条目，涵盖生物过程

（BP）、细胞成分（CC）和分子功能（MF）三大类别。以满足q<0.05为筛选条件，在三大类别中筛选部分可能与茎表皮毛相关的GO条目并作图。BP类显著富集表皮毛分化（GO：0010026）、表皮毛形态建成（GO：0010090）、表皮毛模式建成（GO：0048629）、毛细胞分化（GO：0035315）等；CC类的细胞连接（GO：0030054）、细胞前缘（GO：0031252）及MF类DNA结合转录因子活性（GO：0003700）、葡萄糖基转移酶活性（GO：0046527）、细胞骨架马达活性（GO：0003774）等功能相关条目也显著富集。推测这些条目与蒙古黄芪茎表皮毛的生长发育相关。



第1圈表示富集条目与对应分类，分别为生物过程（蓝色），分子功能（灰色）和细胞成分（红色）3种类型；第2圈显示每个条目中背景基因的数目及该分类的统计显著性值-$\log_{10}$（q value），条形图越长表示富集到该GO条目基因越多，颜色越深代表q值越小，富集越显著；第3圈表示前景基因总数，条形图越长表示基因数目越多；第4圈不同高低条形图表示富集因子大小，越高代表富集因子越大

The first circle represents the enriched terms and their corresponding categories, namely biological process (blue), molecular function (gray), and cellular component (red). The second circle shows the number of background genes in each term and the statistical significance value -$\log_{10}$ (q value) for the category; a longer bar indicates more genes enriched in the GO term, and a darker color denotes a smaller q value, meaning more significant enrichment. The third circle indicates the total number of foreground genes, with a longer bar standing for a larger number of genes. The fourth circle with bars of different heights represents the enrichment factor, where a higher bar corresponds to a larger enrichment factor

图2 DEGs GO富集分析圈图

Fig. 2 GO enrichment analysis plot of DEGs

2.2.4 KEGG富集分析 为进一步解析DEGs功能分布，选取富集显著的前20条通路进行作图。结果显示（图3），富集最显著的前五条KEGG通路依次为Rap1信号通路（Rap1 signaling pathway）、黏着连接（adherens junction）、马达蛋白（motor proteins）、核糖体（ribosome）及类黄酮生物合成（flavonoid biosynthesis）。此外，异黄酮生物合成通路（isoflavonoid biosynthesis）、苯丙烷生物合成通路（phenylpropanoid biosynthesis）等次生代谢相关通路，以及植物激素信号转导（plant hormone signal transduction）、玉米素生物合成（zeatin biosynthesis）等激素调控相关通路也被显著富集，该结果表明蒙古黄芪茎表皮毛可能与次生代谢调控和激素信号调控密切相关。

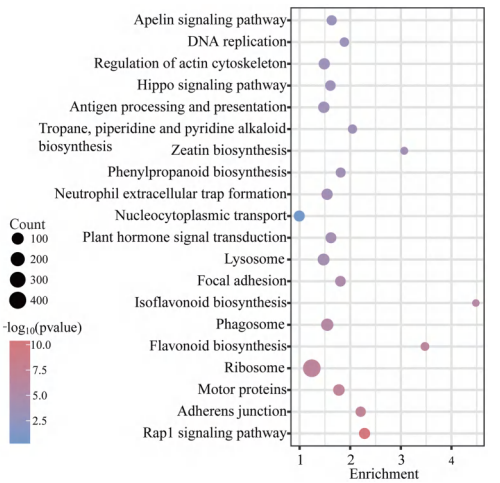


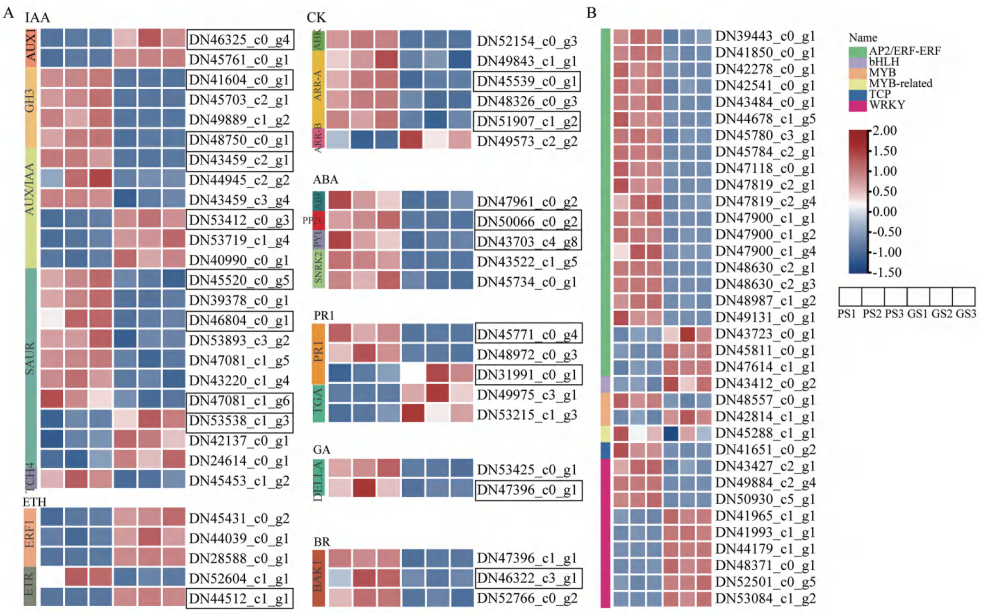
图3 差异表达基因KEGG富集分析图

Fig. 3 KEGG enrichment analysis plot of DEGs

2.2.5 植物激素信号转导通路相关DEGs 已有研究表明，植物激素在表皮毛的起始、分化和发育过程中发挥重要调控作用。上述KEGG通路分析显示，大量DEGs显著富集于植物激素信号转导通路。本研究检测到7类植物激素，包括生长素（IAA）、细胞分裂素（CK）、赤霉素（GA）、水杨酸（SA）、脱落酸（ABA）、乙烯（ETH）、及油菜素内酯（BR）。使用更严格的阈值|$\log_2$FC|≥1，TPM>10、q<0.05（任意一组）作为筛选标准，共筛选到18个高表达植物

激素相关的基因，图中用黑色框标注（图4-A）。例如，生长素信号通路基因*LAX5*（DN46325_c0_g4）、脱落酸信号通路中基因*PP2C6*（DN50066_c0_g2）、细胞分裂素响应调控因子*ARR5*（DN45539_c0_g1）以及赤霉素信号抑制因子*GAI*（DN47396_c1_g1）等。这些基因可能通过参与激素信号通路调控茎表皮毛的发育。

2.2.6　毛状体相关DEGs　为进一步探究转录因子在蒙古黄芪茎表皮毛发育中的调控作用，本研究对DEGs进行了转录因子预测，共鉴定出305个转录因子编码基因，分属43个家族。通过同源比对及功能注释，从中筛选出6个与毛状体发育密切相关的基因，包括5个拟南芥毛状体发育相关同源基因，其中*GIS*（DN39727_c0_g1）、*GIS3-like*（TRINITY_DN42225_c0_g1）、*GIS3*（DN42225_c1_g1）为表皮毛正调控基因，*HAT1*（DN39400_c0_g1）和*ETC1*（DN40755_c0_g1）为表皮毛负调控基因；1个NAC家族基因*NAC40*（DN47683_c1_g1）在无毛茎表皮中下调（附表2）。为进一步筛选高可信度候选基因，使用更严格的阈值（$|\log_2FC|\geq1$，TPM>10，q<0.05）进行筛选，共得到35个高表达DEGs，与PS相比，GS中11个基因上调和24个基因下调（图4-B）。



热图数据为相对表达量(TPM)值按行标准化处理，红色代表每行内基因相对表达量上调，蓝色代表下调，下同

The data in the heatmap are row-normalized relative expression (TPM) values. Red indicates upregulated relative expression within each row and blue indicates downregulation. The same below

图4　激素相关差异表达基因(A)和差异表达转录因子热图(B)

Fig. 4　Heat map of hormone-related DEGs (A) and differentially expressed transcription factors (B)

2.2.7　黄酮途径相关DEGs分析　黄酮类化合物是蒙古黄芪中重要的药效成分之一，同时也是抵御外界胁迫的重要次生代谢产物。本研究基于KEGG富集结果对黄酮生物合成途径的DEGs进行了可视化分析（图5）。结果显示，该途径共有25个DEGs，与PS相比，GS中19个基因上调，6个基因下调。其中，编码查尔酮合成酶（*CHS*）的基因数量最多，4个上调、2个下调；苯丙氨酸解氨酶（*PAL*）、肉桂酸-4-羟化酶（*C4H*）、查尔酮异构酶（*CHI*）和查尔酮还原酶（*CHR*）的编码基因均呈显著上调；相反，参与下游分支的黄烷酮3-羟化酶（*F3H*）和黄酮醇合成酶（*FLS*）相关的3个基因则均显著下调。此外，多个修饰与转化相关基因也发生显著变化，包括4个异黄酮-7-O-甲基转移酶（*7-IOMT*）基因，1个异黄酮-4′-O-甲基转移酶（*HI4OMT*）基因，1个维司酮还原酶（*VR*）基因，1个异黄酮2′-羟化酶（*I2′H*）

基因，2个3′-O-甲基转移酶（*3′OMT*）和1个黄酮醇-3-O-葡萄糖苷-L-鼠李糖基转移酶（*FG2*）基因。

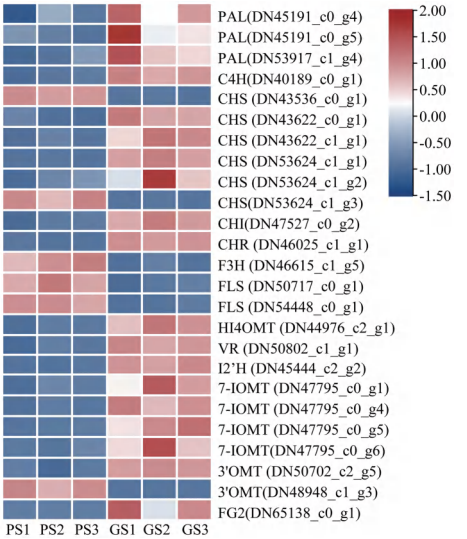


图5 黄酮相关差异表达基因热图

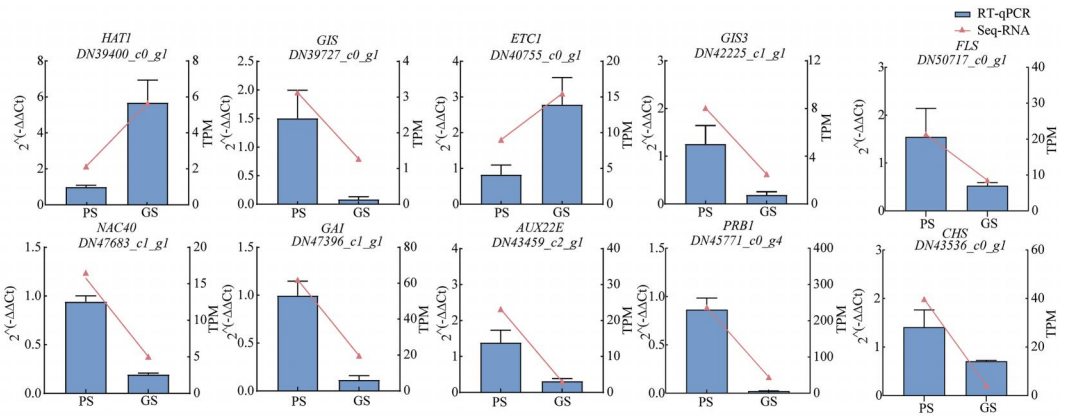
Fig. 5 Heat map of flavonoid-related DEGs

2.3 RT-qPCR验证

为验证转录组测序结果的可靠性，本研究选取5个茎表皮毛发育相关基因（*GIS*、*GIS3*、*NAC40*、*HAT1*、*ETC1*）、3个激素信号通路相关基因（*GAI*、*AUX22E*、*PRB1*）及2个类黄酮生物合成途径关键基因（*FLS*、*CHS*）进行RT-qPCR验证。结果表明（图6），10个基因RT-qPCR与转录组测序结果均一致。

2.4 茎部代谢组学分析

2.4.1 多元统计分析 为了探究茎表皮毛对代谢物的影响，对2组样品进行主成分分析，PCA降维分析结果显示尽管2组对应的样本有分离趋势，但仍存在部分重叠。为此，进一步采用OPLS-DA模型进行分析，该模型可通过去除与分组无关的噪音信息，突出组间差异。OPLS-DA模型结果显示实现了2组间样本完全分离，其第一主成分（Component 1）解释率为23%，为后续筛选差异代谢物奠定了基础（图7）。



柱状图为RT-qPCR测定的各靶基因相对表达水平（$2^{-\Delta\Delta Ct}$），红色线条表示对应RNA-seq（TPM值），$\bar{x}\pm s$，n=3

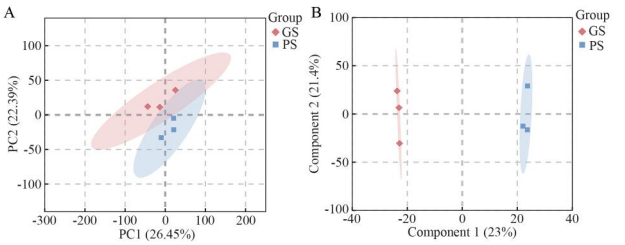
The histograms represent the relative expression levels of each target gene measured by RT-qPCR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), and the red lines indicate the corresponding RNA-seq (TPM values), $\bar{x}\pm s$, n=3

图6 RT-qPCR验证结果图

Fig. 6 Validation results of RT-qPCR

2.4.2 DAMs分析 基于条件（VIP>1，|Fold change|≥2或≤0.5）共筛到670个DAMs。与PS相比，GS中443个代谢物含量升高，227个代谢物含量降低（图8-A）。这些DAMs可分为20类，其中以有机酸（130个）、氨基酸及其衍生物（116个）、苯及其衍生物（88个）和黄酮类（44个）数量较多（图8-B）。

为探究蒙古黄芪茎表皮毛与主要次级代谢产物之间的关联，进一步对黄酮类与皂苷类DAMs进行分析。黄酮类包含15个黄酮醇、12个黄酮、9个异黄酮、5个查尔酮、2个二氢黄酮、1个黄烷醇。与PS相比，GS中39个黄酮类代谢物升高，5个降低，两种表型在黄酮积累模式上差异显著。其中，芒柄



PC1表示第一主成分，PC2表示第二主成分，百分比表示该主成分对数据集的解释率；图中的每个点表示1个样品，同一个组的样品使用同一种颜色表示

PC1 represents the first principal component and PC2 the second principal component, with the percentages indicating their respective explanation rates of the dataset; each dot in the figure denotes a sample, and samples from the same group are colored the same

图7　代谢物PCA(A)和OPLS-DA(B)图

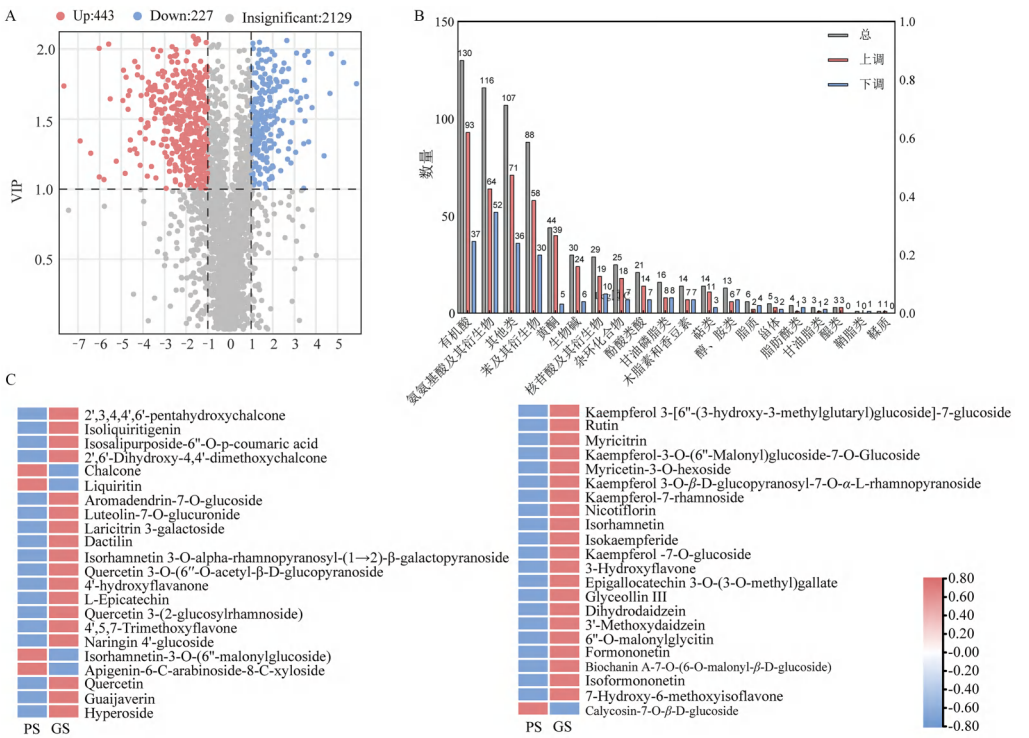
Fig. 7　PCA (A) and OPLS-DA (B) score plots of metabolites

花素、异刺芒柄花素与异甘草素等成分在GS中含量均升高，查尔酮、甘草苷、毛蕊异黄酮苷等在GS中含量均降低（图8-C）。皂苷类成分中，仅黄芪皂苷III在GS中显著升高，黄芪甲苷、黄芪皂苷I以及黄芪皂苷II等其余主要皂苷类成分均未表现出显著差异。

2.4.3　KEGG富集分析　为进一步解析DAMs功能分布，选取富集分析靠前的10条通路进行作图。结果表明（图9），排名前5的KEGG通路依次为苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成（phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis）、色氨酸代谢（tryptophan metabolism）、核苷酸代谢（nucleotide metabolism）、硫胺酸代谢（thiamine metabolism）、维生素B_6代谢（vitamin B_6 metabolism）。

2.5　茎部类黄酮代谢通路DEGs和DAMs关联分析

根据转录组及代谢组数据分析结果，构建茎部类黄酮通路图。以PS为对照，显示结构基因与代谢物表达关系（图10）。苯丙烷代谢途径是调控黄酮类化合物积累的核心上游通路，该途径中*PAL*、*C4H*和*CHI*基因均呈显著上调表达。*CHS*是类黄酮途径起始酶，GS中*CHS* 4个基因上调和2个基因下调，*CHR*基因上调，该通路直接代谢物异甘草素上调。



A：DAMs火山图；B：DAMs分类图；C：黄酮差异积累代谢物热图

A: volcano plot of DAMs; B: classification chart of DAMs; C: heat map of differentially accumulated flavonoid metabolites

图8　DAMs数据图

Fig. 8　Data plot of DAMs

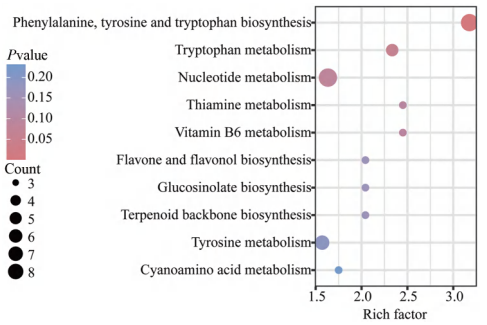


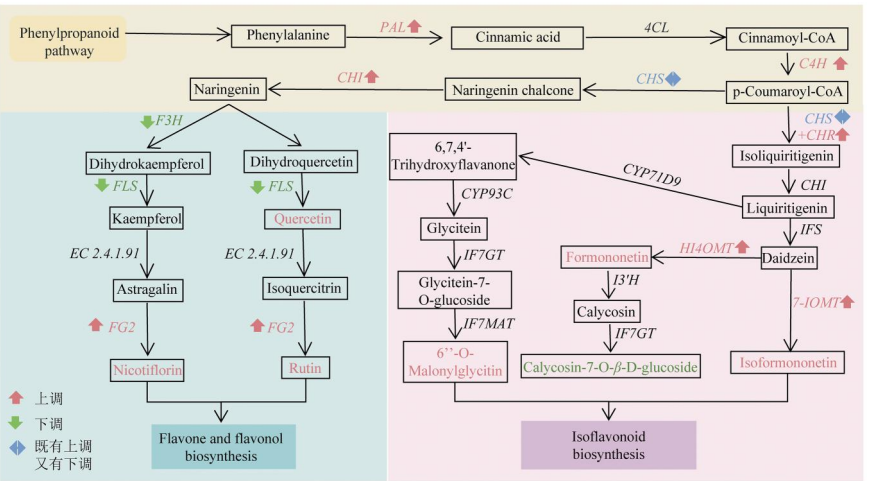
图9 DAMs KEGG富集分析图

Fig. 9 KEGG enrichment analysis plot of DAMs

黄酮醇和异黄酮合成途径为类黄酮下游分支。在异黄酮代谢途径中，4个*7-IOMT*基因和1个*HI4OMT*基因表达显著上调，与相应代谢物芒柄花素、异刺芒柄花素及6′′-O-丙二酰黄豆苷含量升高趋势一致。在黄酮和黄酮醇代谢途径中，*FLS*是黄酮醇合成路径上的核心节点基因，呈现下调表达，而代谢物槲皮素上调，推测该过程可能存在负反馈调节。该途径下游结构基因*FG2*表达上调，与代谢物山奈酚-3-O-芸香糖苷和芦丁含量升高趋势一致。

2.6 蒙古黄芪中黄酮和皂苷类成分含量测定结果

2.6.1 线性回归及方法学考察结果 HPLC分析结果表明，4种黄酮类与4种皂苷类成分在各自浓度范围内均呈现良好的线性关系，线性相关系数r^2均大于0.999（表1、附图4）。方法学考察结果显示，8种成分精密度和重复性试验结果均符合相关要求，样品溶液在24 h内稳定性良好；加样回收试验表明该方法准确度较高（附表3）。



方框内标注的为代谢物：红色表示代谢物含量升高，绿色表示代谢物含量降低；箭头旁标注的为相关基因：红色标注的基因表示表达上调，绿色标注的基因表示表达下调，蓝色表示既有上调又有下调基因；图中不同颜色的矩形框对应不同的代谢分支：黄色代表苯丙烷代谢途径，粉色代表异黄酮代谢途径，蓝色代表黄酮和黄酮醇代谢途径

Metabolites are marked in boxed labels: red indicates significantly increased metabolite content, while green indicates decreased metabolite content. Related genes are annotated beside the arrows: red represents upregulated genes, green represents downregulated genes, and blue indicates genes with both upregulated and downregulated expression patterns. Rectangular boxes of different colors in the diagram correspond to distinct metabolic branches: the yellow box denotes the phenylpropanoid pathway, the pink box represents the isoflavonoid pathway, and the blue box refers to the flavone and flavonol biosynthesis pathway

图10 茎部类黄酮通路DEGs和DAMs图

Fig. 10 Diagram of DEGs and DAMs in the flavonoid pathway of stems

2.6.2 黄酮及皂苷成分定量分析 为探究蒙古黄芪茎表皮毛对药效成分的影响，本研究对两组间茎和根黄酮和皂苷类成分进行含量测定分析。由于茎部皂苷含量较低，皂苷成分检测不完整，故茎部数据仅针对黄酮成分进行分析。结果表明，根部毛蕊异黄酮苷和芒柄花苷含量均远高于毛蕊异黄酮和芒柄花素，茎部4种异黄酮成分含量均较低。4种异黄酮总量在不同部位均无显著差异，无毛茎根部（GHR）4种皂苷成分总量显著低于多毛茎根部（PHR）（1.65 mg/g<1.98 mg/g）。其中，无毛茎茎部（GHS）

表1　蒙古黄芪黄酮和皂苷类线性回归方程

Table 1　Linear regression equations for flavonoids and saponins in *A. mongholicus*

化合物 Compound	线性方程 Linear regression equation	R^2	线性范围 Linear range (μg)
毛蕊异黄酮苷	*Y*=39 109 157 *C*+180 233	0.999 5	0.050–4.970
芒柄花苷	*Y*=27 793 749 *C*–48 296	0.999 8	0.128–7.680
毛蕊异黄酮	*Y*=6 355 527 *C*–7 323	0.999 9	0.038–2.280
芒柄花素	*Y*=5 436 799 *C*–20 586	0.999 8	0.031–1.860
黄芪甲苷	*Y*=1.660 2 *C*+5.335 3	0.999 2	0.180–3.300
黄芪皂苷I	*Y*=1.543 2 *C*+5.947 6	0.999 9	0.588–9.420
黄芪皂苷II	*Y*=1.585 7 *C*+5.442	0.999 5	0.300–4.800
黄芪皂苷III	*Y*=1.323 2 *C*+6.408	0.999 8	0.242–3.880

毛蕊异黄酮苷含量极显著低于多毛茎茎部（PHS）（0.04 mg/g<0.11 mg/g，*P*<0.01），芒柄花素含量显著高于PHS（0.02 mg/g>0.01 mg/g，*P*<0.05）；GHR毛蕊异黄酮含量显著低于PHR（0.13 mg/g<0.25 mg/g，*P*<0.05）（表2）。

表2　蒙古黄芪黄酮和皂苷类含量测定结果

Table 2　Determination results of flavonoid and saponin contents in *A. mongholicus* ($\bar{x}\pm s$, *n*=10)

组别(mg/g)	PHS	GHS	PHR	GHR
毛蕊异黄酮苷	0.11±0.04	0.04±0.01**	1.48±0.50	1.76±0.35
芒柄花苷	0.04±0.01	0.04±0.01	0.53±0.37	0.44±0.17
毛蕊异黄酮	0.15±0.08	0.18±0.06	0.25±0.12	0.13±0.07#
芒柄花素	0.01±0.01	0.02±0.01*	0.04±0.03	0.02±0.03
4种异黄酮总和	0.32±0.08	0.28±0.05	2.30±0.52	2.35±0.50
黄芪甲苷	–	–	0.25±0.07	0.26±0.08
黄芪皂苷I	–	–	1.05±0.24	0.78±0.35
黄芪皂苷II	–	–	0.61±0.18	0.48±0.16
黄芪皂苷III	–	–	0.08±0.01	0.13±0.07
4种皂苷成分总和	–		1.98±0.36	1.65±0.36#

注：与PHS相比，GHS *P<0.05、**P<0.01；与PHR相比，GHR #P<0.05

Note: Compared with PHS, *P<0.05 and **P<0.01 for GHS; compared with PHR, #P<0.05 for GHR

3　讨论

研究表明，非腺毛在植物抗寒、耐旱、抗紫外线及防御虫害等方面发挥重要作用，较高的非腺毛密度常与较低的气孔密度共同促进植株的抗旱能力[19]。本研究多毛茎蒙古黄芪表皮分布有大量非腺毛，无毛茎表皮光滑具较高的气孔密度。

GIS、*GIS3*和*GIS3-like*属于*C2H2*锌指蛋白转录因子家族，可以促进植物表皮毛的发育。*GIS*常与赤霉素和细胞分裂素信号协同作用，尤其在茎表皮毛形成中发挥作用；而*GIS3*则可通过直接激活*GIS*的表达来调控表皮毛形成[20-21]。*GIS3-like*作为类似物可能具有与*GIS3*相似的功能。*HAT1*属于同源异形域–亮氨酸拉链蛋白II家族（*HD-ZIP II*）转录因子，在拟南芥中，*HAT1*通过构成*HAT1-DELLA*信号模块维持赤霉素稳态，从而抑制表皮毛的起始[22-23]。*ETC1*是*R3-MYB*转录因子家族成员，也是毛状体发育的关键负调控因子。在拟南芥中，*ETC1*与bHLH蛋白竞争相结合阻止MBW正调控复合物的组装，进而抑制下游*GL2*等毛状体分化关键基因的表达，最终减少表皮毛数量[24]。*NAC*转录因子家族成员也与表皮毛形成有关[25]。本研究筛选出*GIS*、*GIS3-like*、*GIS3*、*HAT1*、*ETC1*、*NAC40*6个与茎部表皮毛形成高度相关的基因，表明这些基因可能参与表皮毛的合成。植物激素在表皮毛形成和发育中扮演重要角色，细胞分裂素和赤霉素对非腺毛发育具有正向调控作用[26-27]。本研究筛选到赤霉素信号相关基因*GAI*在多毛茎中高表达，乙烯、赤霉素、脱落酸、细胞分裂素和油菜素甾醇多个激素通路差异表达基因。*WRKY*家族成员与表皮毛生成有关，*AP2/ERF*家族则参与调控植物发育及多种植物激素信号通路[28]，推测文中筛选到的这些转录因子家族基因与茎表皮毛合成有关，但目前这些基因还未有相关研究报道，有待后续进一步功能验证。

茎部类黄酮途径中，*CHS*是黄酮类生物合成途径中的第一个限速酶，*CHI*则为类黄酮代谢的关键节点酶，连接上游*CHS*与下游各分支特异性酶，其活性直接影响中间产物的转化效率与下游各分支特异性酶[29]。*CHR*作为异黄酮途径中的查尔酮还原酶，可与*CHS*形成复合体共同催化异甘草素的合成[30]，这与本研究结果相一致。基因*FG2*、*7-IOMT*、*HI4OMT*与其对应的代谢物表达趋势一致，呈现典型的“基因–代谢物”正相关关系。此外，*FLS*与植物黄酮醇成分的积累有关，还会影响植物的生长状况[31]。本研究中槲皮素等黄酮醇含量显著升高，与*FLS*表达趋势相反，这一现象可能源于

负反馈调节机制或黄酮醇受上游*CHI*和*CHS*基因的调控[32]。黄酮醇类化合物在植物应对胁迫中发挥重要作用，因其含酚羟基可清除活性氧而帮助植株抵御外界不良环境[33]。与多毛茎表皮相比，无毛茎表皮中槲皮素及其衍生物等黄酮醇类化合物显著上调，先前研究观察发现无毛茎表型在采收期表现出更早枯萎现象，表明茎表皮毛的缺失在一定程度上可能削弱植株对环境胁迫的防御能力，黄酮醇类代谢物积累升高可能是植物适应环境的主动防御，这与木棉上部少刺区相关代谢物含量升高的结果相一致[26]。这些可为黄芪地上部分资源的开发利用及植物抗逆等提供参考。

不同茎表皮毛蒙古黄芪在黄酮和皂苷积累上存在差异。与多毛茎相比，无毛茎茎部的毛蕊异黄酮苷含量呈现极显著降低趋势，而芒柄花素含量则显著升高；无毛茎根部的毛蕊异黄酮含量以及四种皂苷类成分的总含量均显著下降。茎部和根部代谢物不完全一致的现象表明，两种表型蒙古黄芪茎和根在黄酮类、皂苷类等次生代谢产物的合成、转运及分配过程中可能存在组织特异性差异。黄芪药材的品质评价通常以根部活性成分为核心依据，综合分析多项指标性成分，表明多毛茎较无毛茎表型更优。此外，本研究采集的黄芪样品均处于地上部分生长旺盛期，其药效成分含量也受采收时间、生长环境及遗传因素等多种因素影响，因此上述结论仅为现有数据的初步推断；同时，转录组与代谢组学分析仅局限于茎部，尚未涉及根部多组学关联机制的深入解析，相关研究还有待进一步开展。

4 结论

蒙古黄芪茎部表皮毛为非腺毛，转录组分析筛选出多个参与表皮毛形成、激素信号转导及黄酮代谢的差异基因。无毛茎表皮蒙古黄芪多数黄酮代谢物含量升高，可能是植物适应环境的主动防御。蒙古黄芪茎表皮毛与异黄酮类和皂苷类药效成分积累存在一定关联，综合分析表明多毛茎较无毛茎表型更优。

文章所有附图附表请点击链接查看（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260507173243_NewsFile_8.pdf）

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-一部——2025年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2025.
National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of people′s republic of China (PRC)-part I-2025 edition [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2025.

[2] 王丹阳, 冯毅晖, 潘加豪, 等. 黄芪的主要化学成分及药理作用[J]. 新农民, 2024(24): 126-128.
Wang DY, Feng YH, Pan JH, et al. Main chemical constituents and pharmacological effects of *Astragalus membranaceus* [J]. New Farmers, 2024(24): 126-128.

[3] 张桅儇, 刘海龙, 王瑞琼, 等. 黄芪化学成分和药理作用及Q-marker预测分析[J]. 中国新药杂志, 2023, 32(4): 410-419.
Zhang YX, Liu HL, Wang RQ, et al. Chemical constituents and pharmacological effects of *Astragali Radix* and predictive analysis on quality markers [J]. Chin J New Drugs, 2023, 32(4): 410-419.

[4] Karabourniotis G, Liakopoulos G, Nikolopoulos D, et al. Protective and defensive roles of non-glandular trichomes against multiple stresses: structure-function coordination [J]. J For Res, 2020, 31(1): 1034.

[5] 植汉成, 刘翔, 郭宝林, 等. 柔毛淫羊藿及其近缘种叶片非腺毛形态及其分类学意义[J]. 西北植物学报, 2018, 38(11): 2023-2035.
Zhi HC, Liu X, Guo BL, et al. Leaf non-glandular hair morphology and its taxonomic significance in *Epimedium pubescens* and related species [J]. Acta Bot Boreali Occidentalia Sin, 2018, 38(11): 2023-2035.

[6] Wang ZJ, Li YH, Zhang HY, et al. Methyl jasmonate treatment, aphid resistance assay, and transcriptomic analysis revealed different herbivore defensive roles between tobacco glandular and non-glandular trichomes [J]. Plant Cell Rep, 2022, 41(1): 195-208.

[7] Li C, Wu JT, Blamey FPC, et al. Non-glandular trichomes of sunflower are important in the absorption and translocation of foliar-applied Zn [J]. J Exp Bot, 2021, 72(13): 5079-5092.

[8] Guo C, Hu JJ, Gao WQ, et al. Mechanosensation triggers enhanced heavy metal ion uptake by non-glandular trichomes [J]. J Hazard Mater, 2022, 426: 127983.

[9] Frerigmann H, Böttcher C, Baatout D, et al. Glucosinolates are produced in trichomes of *Arabidopsis thaliana* [J]. Front Plant Sci, 2012, 3: 242.

[10] Judd R, Bagley MC, Li MZ, et al. Artemisinin biosynthesis in non-glandular trichome cells of *Artemisia annua* [J]. Mol Plant, 2019, 12(5): 704-714.

[11] Koudounas K, Manioudaki ME, Kourti A, et al. Transcriptional profiling unravels potential metabolic activities of the olive leaf non-glandular trichome [J]. Front Plant Sci, 2015, 6: 633.

[12] Shen YH, Fu JC, Zong DY, et al. The multidimensional regulatory

network of trichome development: from transcription factors to hormone signaling integration [J]. J Exp Bot, 2025: eraf457.

[13] 刘艳霞, 马亚丽, 兰海燕. 植物非腺毛形态发生及其功能研究进展 [J]. 植物生理学报, 2018, 54(10): 1527-1534.
Liu YX, Ma YL, Lan HY. Advances in morphology and function of plant non-glandular trichomes [J]. Plant Physiol J, 2018, 54(10): 1527-1534.

[14] Song SS, Liu B, Song JQ, et al. A molecular framework for signaling crosstalk between jasmonate and ethylene in anthocyanin biosynthesis, trichome development, and defenses against insect herbivores in *Arabidopsis* [J]. J Integr Plant Biol, 2022, 64(9): 1770-1788.

[15] 邵长生. 二球悬铃木表皮毛发育调控基因*PaTCP4*、*PaTCP15*和*PaNAC089*的功能分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2021.
Shao CS. Functional analysis of trichomes development regulatory genes *PaTCP4*、*PaTCP15* and *PaNAC089* from *Platanus acerifolia* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021.

[16] Davila-Velderrain J, Caldu-Primo JL, Martinez-Garcia JC, et al. Modeling the epigenetic landscape in plant development [M]// Computational Cell Biology. New York, NY Springer New York 2018: 357-383.

[17] 高四云, 李科, 熊一峰, 等. 恒山仿野生黄芪绝对生长年限鉴别及黄酮和皂苷积累规律研究 [J]. 药学学报, 2018, 53(1): 147-154.
Gao SY, Li K, Xiong YF, et al. Identification of growth years of Hengshan imitative wild culture *Astragali Radix* and investigation into the accumulation rules of flavonoids and saponins [J]. Acta Pharm Sin, 2018, 53(1): 147-154.

[18] 李新星, 刘凤波, 王雅净, 等. 不同产地蒙古黄芪中12种药效成分含量差异及其与地理分布和气候因子相关性分析 [J]. 中草药, 2024, 55(20): 7085-7092.
Li XX, Liu FB, Wang YJ, et al. Differences in content of 12 medicinal components of *Astragalus membranaceus* var. *mongolicus* from different regions and their correlation with geographical distribution and climate factors [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(20): 7085-7092.

[19] Narayan S, Kumar A, Shirke PA. Development of stomata and trichomes is correlated with improved water use efficiency in cluster bean [*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.] under drought [J]. J Plant Growth Regul, 2025, 44(7): 4090-4107.

[20] Sun LL, Zhang AD, Zhou ZJ, et al. *GLABROUS INFLORESCENCE STEMS3* (*GIS3*) regulates trichome initiation and development in *Arabidopsis* [J]. New Phytol, 2015, 206(1): 220-230.

[21] Zhang N, Yang L, Luo S, et al. Genetic evidence suggests that GIS functions downstream of TCL1 to regulate trichome formation in *Arabidopsis* [J]. BMC Plant Biol, 2018, 18: 63.

[22] Ariel FD, Manavella PA, Dezar CA, et al. The true story of the HD-Zip family [J]. Trends Plant Sci, 2007, 12(9): 419-426.

[23] Tan WR, Han Q, Li Y, et al. A HAT1-DELLA signaling module regulates trichome initiation and leaf growth by achieving gibberellin homeostasis [J]. New Phytol, 2021, 231(3): 1220-1235.

[24] Zhang YP, Zhang JQ, Shao CS, et al. Single-repeat R3 MYB transcription factors from *Platanus acerifolia* negatively regulate trichome formation in *Arabidopsis* [J]. Planta, 2019, 249(3): 861-877.

[25] Xin Y, Pan WQ, Zhao YJ, et al. The NAC transcription factor LpNAC48 promotes trichome formation in *Lilium pumilum* [J]. Plant Physiol, 2024, 197(1): kiaf001.

[26] 邵一帆, 朱宝庆, 王童欣, 等. 基于激素、转录组和代谢组研究木棉皮刺的遗传调控 [J]. 园艺学报, 2025, 52(4): 933-946.
Shao YF, Zhu BQ, Wang TX, et al. Research of genetic regulation of *Bombax ceiba* prickle based on hormone, transcriptome and metabolome [J]. Acta Hortic Sin, 2025, 52(4): 933-946.

[27] Chen HY, Zhu Z, Wang XW, et al. Less hairy leaf 1, an RNaseH-like protein, regulates trichome formation in rice through auxin [J]. J Integr Agric, 2023, 22(1): 31-40.

[28] Xu ZS, Chen M, Li LC, et al. Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement [J]. J Integr Plant Biol, 2011, 53(7): 570-585.

[29] 潘媛, 赵晓, 陈大霞. 灰毡毛忍冬花不同发育阶段的转录组学与代谢组学研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2798-2805.
Pan Y, Zhao X, Chen DX. Different development phase of transcription proteomics and metabolomics of flower of *Lonicera macranthoides* [J]. China J Chin Mater Med, 2021, 46(11): 2798-2805.

[30] 崔慧敏, 曲硕, 万金璐, 等. 大豆*CHR2-1*基因生物信息学分析与大豆遗传转化 [J]. 大豆科学, 2022, 41(3): 274-280.
Cui HM, Qu S, Wan JL, et al. Bioinformatics analysis of soybean *CHR2-1* gene and its genetic transformation to soybean [J]. Soybean Sci, 2022, 41(3): 274-280.

[31] 张宇斌, 彭贵, 潘蓉蓉, 等. 日本蛇根草黄酮醇合成酶基因的克隆及其序列分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(7): 2958-2963.
Zhang YB, Peng G, Pan RR, et al. Cloning and sequence analysis of *FLS* gene in *Ophiorrhiza japonica* [J]. Genom Appl Biol, 2018, 37(7): 2958-2963.

[32] Jiang WB, Yin QG, Wu RR, et al. Role of a *Chalcone* isomerase-like protein in flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. J Exp Bot, 2015, 66(22): 7165-7179.

[33] Gautam H, Sharma A, Trivedi PK. The role of flavonols in insect resistance and stress response [J]. Curr Opin Plant Biol, 2023, 73: 102353.

（责任编辑　张婷婷）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):222-229

日本落叶松*LkNiR*启动子的克隆及表达特性分析

武郁洁 王宇倩 刘翠双 郁羽宵 耿静泽 盖颖*
（1.林木遗传育种全国重点实验室 北京林业大学生物科学与技术学院,北京 100083；2.树木花卉育种生物工程国家林业和草原局重点实验室,北京 100083）

摘 要：【目的】亚硝酸盐还原酶（nitrite reductase, NiR）是植物氮同化关键酶，可催化亚硝酸盐还原为铵态氮，保障氮同化高效进行。研究日本落叶松（*Larix kaempferi*）*LkNiR*基因启动子的表达特性及亚硝酸盐胁迫响应规律，为选育氮高效利用型林木品种提供理论支撑。【方法】从日本落叶松基因组DNA中克隆*LkNiR*启动子序列，利用PlantCARE与PLACE数据库预测顺式作用元件；构建*LkNiR*-GFP报告载体，通过农杆菌介导的遗传转化获得转基因烟草（*Nicotiana tabacum*）及日本落叶松毛状根，结合PCR鉴定、荧光观察与RT-qPCR技术检测启动子活性；以100 mmol/L亚硝酸钠处理日本落叶松幼苗，采用RT-qPCR技术分析*LkNiR*基因的时序表达模式。【结果】*LkNiR*基因启动子（登录号：PV700087）全长1 941 bp，含TATA-box、CAAT-box等核心元件及多种激素与胁迫响应元件，*LkNiR*启动子含9个氮同化响应顺式元件。该启动子在转基因烟草中呈现组织偏好性表达，在根中活性较*CaMV35S*启动子高92.1%，在落叶松毛状根中活性较*CaMV35S*启动子高103.3%。亚硝酸盐胁迫下，*LkNiR*基因表达呈时空分化，根中早期快速响应，茎中响应平缓，叶中诱导最强且持续。【结论】*LkNiR*启动子具有明显的根部偏好表达特性，其活性受亚硝酸盐信号诱导且具有时空分化特征，在日本落叶松氮同化与逆境响应过程中发挥关键调控作用。

关键词： 亚硝酸盐还原酶；启动子；日本落叶松；毛状根；氮同化；亚硝酸盐胁迫；顺式作用元件；表达分析
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0173

Cloning and Expression Characteristics Analysis of *LkNiR* Promoter from *Larix kaempferi*

WU Yu-jie WANG Yu-qian LIU Cui-shuang YU Yu-xiao GENG Jing-ze GAI Ying*
（1. *State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing* 100083; 2. *The Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology Laboratory of National Forestry and Grassland Administration, Beijing* 100083）

Abstract:【Objective】Nitrite reductase (NiR) is a key plant nitrogen assimilation enzyme that catalyzes nitrite reduction to ammonium nitrogen and ensures efficient nitrogen assimilation. This study investigated *Larix kaempferi LkNiR* promoter expression features and nitrite stress response mechanisms and provided theoretical support for breeding forest trees with high nitrogen use efficiency.【Method】The *LkNiR* promoter sequence was cloned from *L. kaempferi* genomic DNA, and screened for *cis*-acting elements using PlantCARE and PLACE databases. The *LkNiR*-GFP reporter vector was constructed, and transgenic tobacco as well as *L. kaempferi* hairy roots were obtained via *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. Promoter activity was detected by PCR identification, fluorescence observation, and RT-qPCR assays. *L. kaempferi* seedlings were treated with 100 mmol/L sodium nitrite, and the *LkNiR* gene temporal expression pattern was analyzed via RT-qPCR.【Result】The full-length *LkNiR* gene promoter (Accession No.: PV700087) was 1 941 bp, containing core elements (e.g., TATA-box, CAAT-box), multiple hormone-responsive elements, and stress-responsive elements. Notably, the *LkNiR* promoter harbored nine *cis*-acting elements involved in nitrogen assimilation. The promoter exhibited tissue-preferential expression in transgenic tobacco, with 92.1% higher activity in roots than the *CaMV35S* promoter, and 103.3% higher activity in *L. kaempferi* hairy roots than the *CaMV35S* promoter. Under nitrite stress, *LkNiR* expression showed spatiotemporal divergence: roots displayed a rapid early response, stems exhibited a moderate response, and

收稿日期：2026-02-04
基金项目：国家重点研发计划项目（2022YFD2200100）
*通信作者：盖颖 gaiying@bjfu.edu.cn

needles had the strongest and most sustained induction.【Conclusion】The *LkNiR* promoter exhibits significant root-preferential expression characteristics, its activity is induced by nitrite signaling and shows spatiotemporal differentiation features, and it plays a key regulatory role in nitrogen assimilation and stress response in *L. kaempferi*.

Keywords: nitrite reductase; promoter; *Larix kaempferi*; hairy root; nitrogen assimilation; nitrite stress; *cis*-acting elements; expression analysis

氮素是蛋白质、核酸等关键生物大分子的基本组成元素[1]，其可利用性直接制约林木生产力的提升及生态功能的发挥。林地氮素可利用性偏低、植株氮素利用效率不高，是限制林木速生性状表达、人工林培育成效提升的核心瓶颈[2-3]。在全球氮循环中，大气氮需经硝化、反硝化等微生物介导的过程转化为植物可吸收的无机氮形态[4-5]。林木作为陆地生态系统的主体，是驱动森林氮循环的关键环节，其对氮素的高效获取与利用不仅依赖体内精准的氮同化代谢途径，也是其适应自然环境的重要基础[6-9]。

在高等植物氮同化过程中，硝酸盐（NO_3^-）向亚硝酸盐（NO_2^-）的还原是关键步骤之一，随后亚硝酸盐进一步还原为铵态氮（NH_4^+），并进入氨基酸合成途径。该过程由亚硝酸盐还原酶（nitrite reductase, NiR）催化完成。NiR广泛存在于植物叶绿体、非绿色组织质体及多种微生物中，依赖铁氧还蛋白等电子供体，通过多步电子传递实现亚硝酸盐的高效还原。该反应不仅避免了亚硝酸盐在生物体内的积累，还为谷氨酸合成酶（GOGAT）途径提供关键底物NH_4^+，从而衔接氨基酸与蛋白质的合成，是氮循环中承上启下的核心生化过程[10-11]。启动子作为*NiR*基因转录调控的核心元件，其顺式作用元件的类型、数量与分布是决定*NiR*表达特性的关键[12-13]，影响植物氮素利用效率及其环境适应性。

氮素作为林木生长的主要限制因子，其利用效率直接关系到人工林的培育成效[14-16]。日本落叶松（*Larix kaempferi*）是优良的造林树种，解析其氮代谢相关基因的转录调控机制对提升其氮素利用能力具有重要意义。生产过程中长期过量施用氮肥，不仅增加人工林培育成本，还易引发土壤酸化、水体面源污染等一系列生态环境问题。因此，通过分子育种手段改良林木自身氮素利用效率，已成为林木遗传改良的重要研究方向[17-18]。然而，目前有关落叶松氮代谢相关基因的转录调控研究较少。

本研究从日本落叶松中克隆*LkNiR*基因启动子序列，系统解析其顺式作用元件组成与跨物种分布特征。同时，在同源日本落叶松及异源红花烟草（*Nicotiana tabacum*）中解析其表达特性，并结合亚硝酸盐胁迫处理探究*LkNiR*的表达响应模式，以期为培育高氮素利用效率的林木新品种提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

烟草与日本落叶松幼苗栽培于灭菌处理的营养土与蛭石混合基质（体积比2∶1）中，培养条件设置为日温23 ℃、光周期16 h光照/8 h黑暗。用于转基因实验的烟草材料采用MS固体培养基（Murashige and Skoog）进行培养，培养基含4.74 g/L MS、30 g/L蔗糖与6 g/L琼脂，pH值调节至5.8。实验所用TOP10菌株、K599菌株、GV3101菌株、反转录试剂盒、目的片段回收试剂盒、质粒提取试剂盒、RNA提取试剂盒、DNA提取试剂盒、荧光定量试剂盒及限制性内切酶等均购自北京艾德莱生物科技有限公司。高保真酶PrimeSTAR®Max DNA polymerase购自TaKaRa公司。

1.2　方法

1.2.1　*LkNiR*启动子克隆及生物信息学分析　根据NCBI数据库中已发表的日本落叶松基因组参考序列，设计一对特异性引物*LkNiR*-F和*LkNiR*-R（引物序列见附表）。随后使用植物基因组DNA快速提取试剂盒从野生型日本落叶松组织中提取DNA，利用PCR技术扩增启动子片段。将获得的PCR产物连接至克隆载体，并送交测序公司进行序列验证。利用PlantCARE在线工具（https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/）和PLACE（http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalup.html）对启动子序列进行顺式作用元件分析。

1.2.2　转基因烟草与落叶松的转化与鉴定　提取实验室保存的pBI121-GFP质粒并进行*Xba* I和*Hin*d III双酶切，用*LkNiR*启动子片段定向替换载体上的

*CaMV35S*启动子。将含有目标启动子的农杆菌于28 ℃振荡培养至OD_{600}为0.6-0.8，采用叶盘法对烟草进行遗传转化。转化后的烟草外植体先置于MS培养基中，在25 ℃条件下暗培养2 d。直至切口处形成愈伤组织并分化出幼芽后，将幼芽移至生根培养基（1/2 MS）中，在相同光照条件下诱导生根。以生长健壮、长势一致的50 d日本落叶松幼苗为外植体，采用切根-裹菌法处理下胚轴残端，将裹菌后的外植体移栽至灭菌的营养土与蛭石（2∶1）混合基质中，于25 ℃、16 h光照/8 h黑暗的恒温培养室中培养10-15 d。具体方法请参照相关文献[19]。提取抗性苗基因组DNA，通过GFP序列片段的PCR扩增进行转基因烟草以及落叶松的分子鉴定，以验证报告基因是否插入基因组中。具体的温度与时间设置为：94 ℃预变性3 min；94 ℃变性10 s、55 ℃退火15 s，30个循环。72 ℃终延伸5 min，4 ℃恒温保存扩增产物，且样本在4 ℃下的存放时长不超过24 h，避免产物降解。PCR产物通过1%琼脂糖凝胶电泳进行分析，引物序列见附表。

1.2.3 实时荧光定量分析 RNA提取使用EASYspin Plus植物RNA快速提取试剂盒，cDNA合成使用荧光定量反转录试剂盒。所有操作需在冰上进行，并在超净工作台内完成。反转录得到的cDNA产物应储存于-20 ℃或-80 ℃，避免降解，并尽量避免反复冻融。使用荧光定量试剂盒进行荧光定量PCR，具体的温度与时间设置为：94 ℃ 2 min；94 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s，40个循环。烟草组织的内参基因选择*AtHSC70*基因，落叶松组织的内参基因选择*LkEF1A1*基因。使用Primer Premier 5.0软件设计特异性引物，引物序列见附表。反应体系在冰上避光配制，设置3组生物学重复和3组技术重复。

1.2.4 荧光观察 采用体视荧光显微镜（Leica，德国）对转基因毛状根进行荧光观察。使用480 nm激发滤光片检测GFP表达，并通过DFC310FX成像系统（Leica）和LAS V4.2软件（Leica）捕获GFP转染的落叶松植株的数字图像。所有图像均使用Image J进行后期处理和分析。

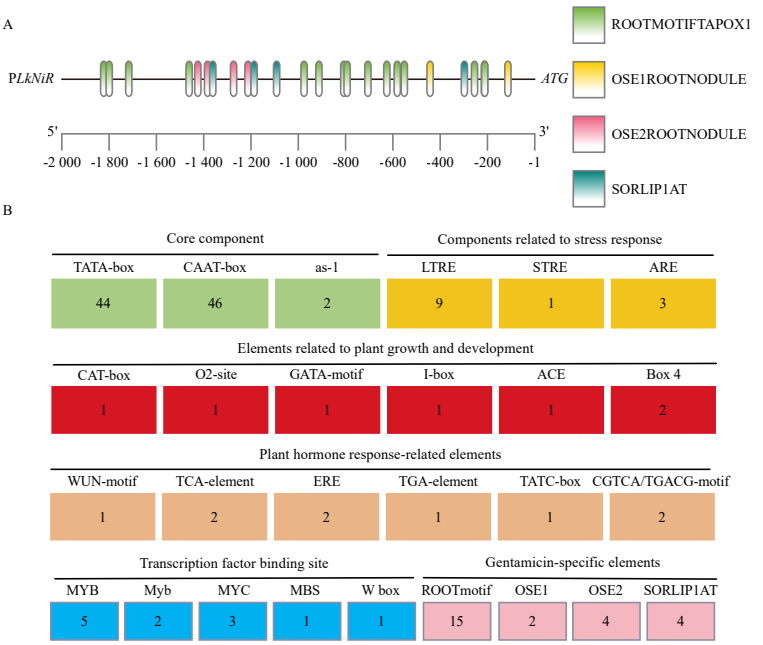
1.2.5 亚硝酸盐胁迫落叶松幼苗 用无菌水配制100 mmol/L亚硝酸钠工作液[20]。选取50 d、长势一致的落叶松幼苗，每瓶落叶松灌根50 mL对应溶液，分别于处理后的0、1、2、4、6、8、10、12、24 h采集根、茎、叶组织。每个时间点取样均包括3株生物学重复，实验独立重复3次。

1.2.6 数据统计分析 采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目的基因的相对表达量，数据以平均值±标准差（mean±SD）表示。使用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析，采用*t*检验（*t*-test）进行两组间差异显著性分析。在检验前，对数据进行正态性检验与方差齐性检验，满足参数检验的前提条件。显著性水平统一设置为：* $P<0.05$，** $P<0.01$，*** $P<0.001$，**** $P<0.000\ 1$水平显著。

2 结果

2.1 *LkNiR*启动子克隆及生物信息学分析

从日本落叶松中克隆得到*LkNiR*启动子（附图），全长1 941 bp，GenBank登录号：PV700087。顺式作用元件分析结果显示其包含多种功能各异的顺式作用元件。其中，核心启动子元件包括TATA-Box和CAAT-Box。激素响应元件涵盖水杨酸响应元件（TCA-element）、茉莉酸甲酯响应元件（ASF1MOTIFCAMV）、赤霉素响应元件（TATC-box）及生长素响应元件（AuxRR-core）。此外，还存在光照响应元件（I-box、Box 4、GATA-motif）、厌氧响应元件（ARE）和高盐响应元件（STRE）、根特异性元件（ROOTMOTIFTAPOX1、OSE1ROOTNODULE）等，其中根特异性元件在启动子上的位置分布以及核心元件数量如图1所示。为明确不同物种*NiR*基因启动子中氮同化响应元件的分布特征，本研究从NCBI数据库中获取油松（*Pinus tabuliformis*）、火炬松（*Pinus taeda*）、挪威云杉（*Picea abies*）、白云杉（*Picea glauca*）、杨树（*Populus trichocarpa*）、拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、大豆（*Glycine max*）、水稻（*Oryza sativa*）和玉米（*Zea mays*）的*NiR*基因启动子序列，同步统计其氮同化响应元件的数量（表1）。结果表明，*NiR*基因启动子的氮同化响应元件数量在不同物种中存在差异。从类群分布特征来看，双子叶植物如大豆（16个）和杨树（14个）的元件数量较多，针叶树类群内部差异较大，落叶松（9个）元件数相对较多，仅次于火炬松（10个），高于挪威云杉（8个）、油松（6个）和白云杉（3个）。草本植物中，水稻中含10个，玉米中含9个，元件数量处于中等偏上



A：*LkNiR*基因启动子根特异性顺式作用元件分布；B：*LkNiR*基因启动子核心顺式作用元件数量

A: Distribution of root-specific *cis*-acting elements in the *LkNiR* gene promoter. B: Number of core *cis*-acting elements in the *LkNiR* gene promoter

图1　*LkNiR*基因启动子顺式作用元件分布

Fig. 1　Distribution of *cis*-acting elements in the *LkNiR* gene promoter

表1　不同物种*NiR*基因启动子中氮同化响应元件数量

Table 1　Number of nitrogen assimilation-responsive elements in *NiR* gene promoters from different species

序号 No.	物种 Species	元件数量 No. of elements
1	落叶松 *Larix kaempferi*	9
2	油松 *Pinus tabuliformis*	6
3	火炬松 *Pinus taeda*	10
4	挪威云杉 *Picea abies*	8
5	白云杉 *Picea glauca*	3
6	杨树 *Populus trichocarpa*	14
7	拟南芥 *Arabidopsis thaliana*	5
8	大豆 *Glycine max*	16
9	水稻 *Oryza sativa*	10
10	玉米 *Zea mays*	9

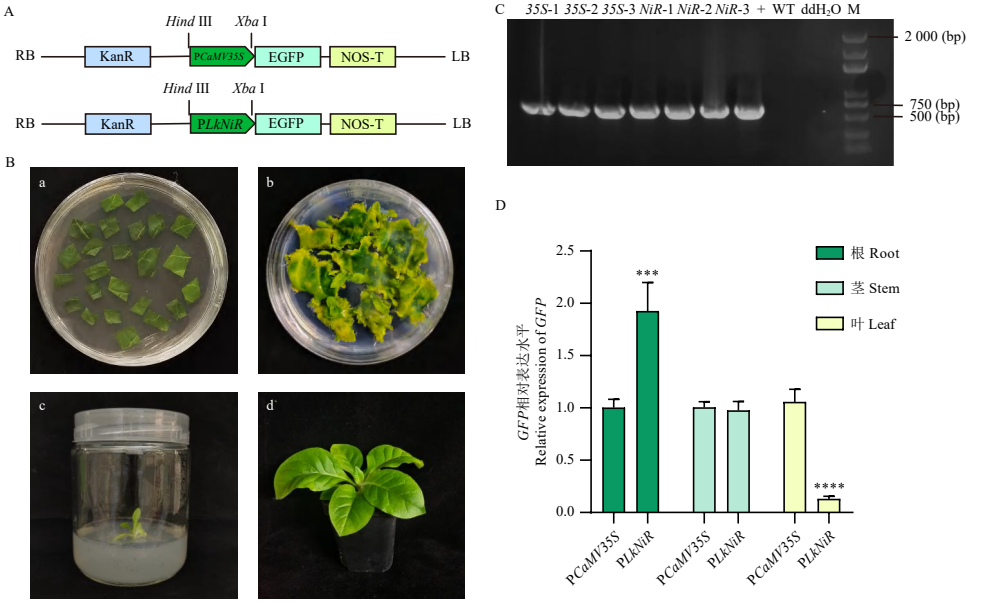
水平，而模式草本植物拟南芥（5个）则处于较低水平。整体分布趋势为：双子叶植物的元件数量最高，禾本科草本作物次之，针叶树类群整体数量跨度较大且均值偏低，模式植物拟南芥的元件数量处于所有供试物种的最低水平。

2.2　*LkNiR*启动子在烟草中的表达特性分析

本研究以*CaMV35S*启动子驱动的根中*GFP*表达量为参照，系统分析了*LkNiR*启动子在异源烟草体系中的组织表达特性与转录活性。结果显示（图2），该启动子呈现根高表达特征。*LkNiR*启动子驱动的*GFP*基因在烟草根中表达量最高，为对照组表达量的1.9–2.3倍，差异极显著。在茎组织中，该启动子调控的*GFP*表达量为对照组的0.9–1.1倍，无显著差异。而在叶组织中，*GFP*表达量仅为对照组表达量的10%–20%，整体呈现清晰的根>茎>叶梯度表达模式。上述结果表明，*LkNiR*启动子具有明显的组织偏好性表达特征，其驱动的目的基因在根中高效表达，而在茎中启动子调控的GFP表达量与对照差异不显著，叶中表达水平显著受抑。

2.3　*LkNiR*启动子在日本落叶松根中的表达分析

为验证*LkNiR*启动子在同源体系中的转录活性，本研究用发根农杆菌对日本落叶松进行侵染转化，荧光镜下观察到P*LkNiR*::GFP转化组与P*CaMV35S*::GFP对照组均表现出健康的表型特征，根系分支发达、色泽鲜白（图3-A）。体视荧光显微镜观察结果



A:重组载体构建示意图;B:转基因烟草植株4个阶段(a:预培养,b:再生培养,c:生根培养,d:炼苗阶段);C:转基因烟草PCR鉴定结果(+:阳性对照,WT:野生型对照,ddH_2O:阴性对照,M:2 000 bp DNA marker);D:转基因烟草根、茎、叶组织中*GFP*基因相对表达量。* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.000\ 1$(*t*-test)。下同

A: Schematic diagram of recombinant vector construction. B: Four stages of transgenic tobacco plants (a: pre-culture, b: regeneration culture, c: rooting culture, d: hardening stage). C: PCR identification result of transgenic tobacco (+: positive control; WT: wild-type control; ddH_2O: negative control; M: 2 000 bp DNA marker). D: Relative expression level of *GFP* gene in roots, stems and leaves of transgenic tobacco.* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.000\ 1$ (*t*-test). The same below

图2 转基因烟草中组织表达分析

Fig. 2 Tissue expression analysis in transgenic tobacco

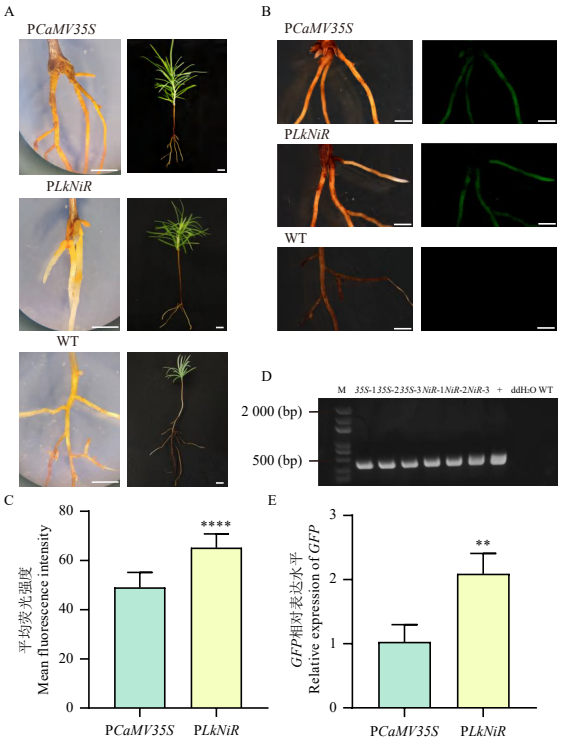
显示（图3-B），转化组和对照组的落叶松毛状根中均能稳定检测到绿色荧光信号，荧光分布均匀且清晰；未转化组则未观察到任何荧光信号，证实*LkNiR*启动子能够有效驱动报告基因*GFP*在落叶松毛状根中实现稳定表达。对荧光强度进行定量分析发现，转化组GFP荧光强度显著高于对照组，其荧光强度平均值约为对照组的1.3–1.4倍（图3-C）。PCR分子鉴定结果显示（图3-D），所有转基因毛状根样品均成功扩增出350 bp的特异性产物，与阳性对照条带完全吻合；而未转化组则未出现相应条带，表明P*LkNiR*::GFP重组载体已成功整合至落叶松基因组中，转化体系稳定可靠。RT-qPCR分析结果进一步显示（图3-E），转化组*GFP*基因表达量为对照组的2.0–2.1倍，与荧光强度定量结果一致，从转录水平证实*LkNiR*启动子在落叶松毛状根中具备高效的转录激活功能。

2.4 *LkNiR*启动子响应亚硝酸盐胁迫的时空表达模式分析

胁迫处理前（0 h），*LkNiR*在根组织中表达量最高，茎和针叶组织中表达量较低，与前文根高表达特征一致，体现其表达模式的物种保守性。胁迫处理后，*LkNiR*的表达展现出明显的时序与组织差异化调控模式。根中表达响应迅速，胁迫后1 h即显著上调1.61倍，2–4 h达到峰值（1.88倍），随后逐渐回落又缓慢升高，至24 h仍维持在1.81倍的高表达水平。茎中表达响应较为平缓，1 h升至1.67倍，之后缓慢下降，24 h又升至1.85倍，在全局反应中绝对表达量一直处于较低状态。叶中响应最为强烈且持久，1 h即急剧上升至2.12倍，4 h达到全局最高点（10.75倍），为同期根、茎组织表达量的5.72倍、5.81倍。此后虽略有波动，但在24 h仍保持在3.80倍的上调水平，是所有组织中诱导幅度最大、持续时间最长的部位（图4）。

3 讨论

植物对氮素的吸收、同化和再分配能力直接决定其生长适应性[21]。在硝态氮同化途径中，NiR催化的亚硝酸盐向铵态氮的转化既是氮同化的必经步



A：落叶松毛状根表型观察，比例尺为5 mm；B：落叶松毛状根GFP荧光观察，比例尺为3 mm；C：转基因毛状根GFP荧光强度定量分析；D：转基因毛状根PCR鉴定结果；E：转基因毛状根*GFP*基因相对表达量

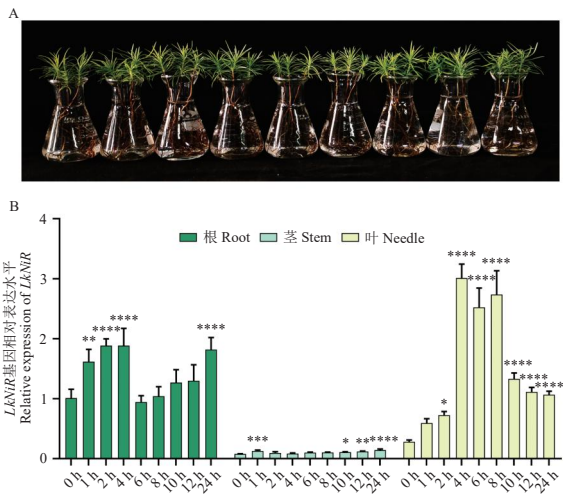
A: Phenotypic observation of *L. kaempferi* hairy roots, scale bar=5 mm. B: GFP fluorescence observation of *L. kaempferi* hairy roots, scale bar=3 mm. C: Quantitative analysis of *GFP* fluorescence intensity in transgenic hairy roots. D: PCR identification result of transgenic hairy roots. E: Relative expression level of *GFP* gene in transgenic hairy roots

图3　转基因落叶松毛状根中*LkNiR*启动子活性分析

Fig. 3　Activity analysis of the *LkNiR* promoter in transgenic *L. kaempferi* hairy roots

骤，也是防止亚硝酸盐在细胞内积累并产生毒害效应的重要保障[22-23]。已有研究表明，在拟南芥[24]、水稻[25]、玉米[26]和杨树[27]等多种植物中，*NiR*的表达水平与氮利用效率、逆境适应能力密切相关，因此其转录调控一直是植物氮代谢研究的重点内容之一。

*LkNiR*启动子富集多种与氮同化以及激素信号传导相关的顺式作用元件，反映了其与落叶松氮同化及亚硝酸盐解毒核心功能的高度适配性。*NiR*启动子通常富含氮响应相关顺式元件，以适应外源氮素供应的动态变化。已有研究证实，拟南芥*NiR1*启动子中存在特异性的硝酸盐响应元件，且该元件在启



A：落叶松幼苗亚硝酸盐胁迫处理示意图；B：亚硝酸盐胁迫下*LkNiR*基因的时空表达模式分析

A: Schematic diagram of nitrite stress treatment on *L. kaempferi* seedlings. B: Spatiotemporal expression pattern analysis of the *LkNiR* gene under nitrite stress

图4　*LkNiR*启动子响应亚硝酸盐胁迫的时空表达模式分析

Fig. 4　Spatiotemporal expression pattern analysis of the *LkNiR* promoter in response to nitrite stress

动子硝酸盐依赖性激活中起决定性作用[28]。在一年生砧木枳（*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.）中，*PtNiR*基因启动子中也检测到该元件[29]。后续研究进一步揭示，这一元件在单子叶植物水稻、玉米与双子叶植物菠菜（*Spinacia oleracea*）、桦木（*Betula* sp.）、烟草中广泛存在，是植物感知并调控体内氮素状态的重要分子基础[30]。值得注意的是，*NiR*基因启动子中氮同化响应元件的数量在针叶树、双子叶木本与草本植物间呈现规律性梯度分布。该特征与其在贫瘠立地条件下仍能维持较好生长势的生态适应性相一致，本质是不同物种适配自身氮利用策略与生态环境的进化结果。此外，*LkNiR*启动子同时富集水杨酸、茉莉酸甲酯等激素响应元件，推测其可通过激素-氮素信号交叉调控实现氮同化过程的精细调节。

*LkNiR*启动子在组织表达特性上表现出显著的根部高表达特征。根系是氮素吸收和亚硝酸盐还原的初级场所，*NiR*基因的高表达可在原位快速清除根部累积的亚硝酸盐，避免其对细胞功能造成毒性损伤，是植物应对亚硝酸盐毒性的第一道核心防线。该根高表达特性在高等植物中具有进化保守性，桦

木*NiR*启动子在转基因烟草中同样呈现根组织偏好性，其-56－-155 bp片段即可介导根部高效表达[31]。而与草本植物相比，多年生林木尤其是日本落叶松的根系需长期维持氮素吸收与同化能力，因此*LkNiR*启动子的根系高表达可能在氮代谢调控方面更具生态适应性意义。综上，*LkNiR*启动子的根部高表达特性可能是植物氮同化基因的普遍调控策略。更重要的是，*LkNiR*启动子在落叶松根系中的转录活性显著高于通用组成型启动子*CaMV35S*，同时避免了组成型启动子无差别表达造成的能量浪费，这是其相较于组成型启动子的核心育种应用优势。

在亚硝酸盐胁迫下，*LkNiR*基因的时空表达模式呈现出明显的组织分化特征，*LkNiR*在根部快速响应，而茎部则相对滞后且幅度较小，叶部诱导效应最强且持续时间最长，在胁迫后4 h的表达高达10.75倍，这可能与亚硝酸盐的代谢特性及其毒性机制密切相关。类似地，20 d菜豆（*Phaseolus vulgaris*）叶片的*NiR*基因在硝酸盐处理后4 h达到表达峰值[32]。这些现象表明，根系作为胁迫信号的初级感知部位，需快速启动基因表达以应对胁迫；茎部响应平缓则与其物质运输通道的功能定位相符；而叶作为植株代谢活动的核心器官，则需在胁迫后期维持较高的表达水平，以支撑全株氮代谢的重构与稳态维持。

目前针叶树遗传转化中，多数使用*CaMV35S*、*Ubiquitin*等组成型启动子[33]，缺乏根部高表达的启动子元件。而本研究鉴定的*LkNiR*启动子，可用于驱动氮同化相关基因在日本落叶松根系中高表达，精准提升根系的氮素吸收与同化效率。该启动子还可进一步拓展至松科其他造林树种的遗传改良，或通过元件重组、原位编辑等技术优化其诱导活性与组织特异性。后续将利用酵母单杂交、EMSA等手段筛选与其互作的转录因子，解析其介导的落叶松氮同化转录调控机制。

4 结论

克隆获得日本落叶松*LkNiR*基因启动子，该启动子具有显著的根高表达特性，在同源及异源体系中均展现出高于*CaMV35S*启动子的转录活性；亚硝酸盐胁迫下，*LkNiR*基因呈现在根中快速响应并在叶中持续高表达的特性，符合NiR催化亚硝酸盐还原的核心功能。研究结果为解析落叶松氮同化调控网络、培育高氮素利用效率林木品种提供了关键依据。

文章所有附图附表请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260512111041_NewsFile_35.pdf）。

参考文献

[1] Chen GD, Wang L, Fabrice MR, et al. Physiological and nutritional responses of pear seedlings to nitrate concentrations [J]. Front Plant Sci, 2018, 9: 1679.

[2] Du EZ, de Vries W. Links between nitrogen limitation and saturation in terrestrial ecosystems [J]. Glob Change Biol, 2025, 31(6): e70271.

[3] Lan YH, Wang SQ, Zhang H, et al. Intercropping and nitrogen enhance eucalyptus productivity through the positive interaction between soil fertility factors and bacterial communities along with the maintenance of soil enzyme activities [J]. Land Degrad Dev, 2023, 34(8): 2403-2417.

[4] Mattoo R, B M S. Microbial roles in the terrestrial and aquatic nitrogen cycle—implications in climate change [J]. FEMS Microbiol Lett, 2023, 370: fnad061.

[5] 李思亮, 刘丛强, 肖化云. 地表环境氮循环过程中微生物作用及同位素分馏研究综述 [J]. 地质地球化学, 2002, 30(4): 40-45.
Li SL, Liu CQ, Xiao HY. Microbial effect on nitrogen cycle and nitrogen isotope fractionation on the Earth's surface-a review [J]. Geology-geochemistry, 2002, 30(4): 40-45.

[6] Gao L, Smith AR, Geng BL, et al. Nitrogen uptake strategies of coexisting plant species in forest ecosystems of Northeast China: Implications for afforestation [J]. For Ecol Manag, 2025, 578: 122481.

[7] Li ZH, Guan LK, Zhang CT, et al. Nitrogen assimilation genes in poplar: Potential targets for improving tree nitrogen use efficiency [J]. Ind Crops Prod, 2024, 216: 118705.

[8] Wang X, Li J, Ge H, et al. Plant traits mediate foliar uptake of deposited nitrogen by mature woody plants [J]. Plant Cell Environ, 2024, 47(12): 4870-4885.

[9] Zhang YJ, Si YL, Ju SB, et al. Synergistic effects of nitrogen deposition and phosphorus distribution patterns on root morphological and chemical traits, and nutrient efficiency in Chinese fir [J]. J Plant Ecol, 2025, 18(4): rtaf062.

[10] 张庆芳, 李美玉, 王晓辉, 等. 微生物亚硝酸盐还原酶的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2019, 46(11): 3148-3157.
Zhang QF, Li MY, Wang XH, et al. Research progress of microbial nitrite reductase [J]. Microbiol China, 2019, 46(11): 3148-3157.

[11] May Sandar Kyaing, 顾立江, 程红梅. 植物中硝酸还原酶和亚硝

酸还原酶的作用 [J]. 生物技术进展, 2011, 1(3): 159-164.
Kyaing MS, Gu LJ, Cheng HM. The role of nitrate reductase and nitrite reductase in plant [J]. Curr Biotechnol, 2011, 1(3): 159-164.

[12] 郭晋艳, 郑晓瑜, 邹翠霞, 等. 植物非生物胁迫诱导启动子顺式元件及转录因子研究进展 [J]. 生物技术通报, 2011, 27(4): 16-20, 30.
Guo JY, Zheng XY, Zou CX, et al. Research progress of *cis*-elements of abiotic stress inducible promoters and associated transcription factors [J]. Biotechnol Bull, 2011, 27(4): 16-20, 30.

[13] 张超, 邓勇, 黄思齐, 等. 红麻亚硝酸还原酶基因*HcNiR*的克隆与表达分析 [J]. 福建农业学报, 2022, 37(5): 600-608.
Zhang C, Deng Y, Huang SQ, et al. Cloning and expression of nitrite reductase gene *HcNiR* in kenaf [J]. Fujian J Agric Sci, 2022, 37(5): 600-608.

[14] 张芸香, 吕世琪, 刘泰瑞, 等. 关帝山3个典型森林群落优势种的氮素利用策略差异 [J]. 林业科学, 2024, 60(2): 12-20.
Zhang YX, Lü SQ, Liu TR, et al. Differentiation of nitrogen use strategies of three typical forest community dominant species in Guandishan forest region [J]. Sci Silvae Sin, 2024, 60(2): 12-20.

[15] Sun C, Xie YH, Li Z, et al. The *Larix kaempferi* genome reveals new insights into wood properties [J]. J Integr Plant Biol, 2022, 64(7): 1364-1373.

[16] Liu Z, Ren H, Zhang S, et al. Effects of long-term nitrogen addition on root nitrogen acquisition strategy: Insights from a 19-year experiment in two temperate tree species [J]. For Ecol Manag, 2024, 570: 122220.

[17] Gao CC, Chen C, Liu N, et al. Genetic diversity and association analysis of traits related to water-use efficiency and nitrogen-use efficiency of *Populus deltoides* based on SSR markers [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(21): 11515.

[18] Qin D, Wu R, Niu L, et al. Optimizing nitrogen use efficiency in forest plantations: mechanistic insights from *Arabidopsis*, crops, and natural forestry ecosystems [J]. For Res, 2025, 5: e029.

[19] Lu JY, Sun N, Tian M, et al. Fluorescent *Larix* hairy root construction and its application to gene function in larch [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2025, 161: 23.

[20] Kasten D, Mithöfer A, Georgii E, et al. Nitrite is the driver, phytohormones are modulators while NO and H_2O_2 act as promoters of NO_2-induced cell death [J]. J Exp Bot, 2016, 67(22): 6337-6349.

[21] Li XW, Zhang CL, Zhang BB, et al. Underappreciated role of canopy nitrogen deposition for forest productivity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2025, 122(34): e2508925122.

[22] Kraus A, Spät P, Timm S, et al. Protein NirP1 regulates nitrite reductase and nitrite excretion in cyanobacteria [J]. Nat Commun, 2024, 15: 1911.

[23] Han X, Wu K, Fu XD, et al. Improving coordination of plant growth and nitrogen metabolism for sustainable agriculture [J]. aBIOTECH, 2020, 1(4): 255-275.

[24] Marchive C, Roudier F, Castaings L, et al. Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants [J]. Nat Commun, 2013, 4: 1713.

[25] Yu J, Xuan W, Tian YL, et al. Enhanced OsNLP4-OsNiR cascade confers nitrogen use efficiency by promoting tiller number in rice [J]. Plant Biotechnol J, 2021, 19(1): 167-176.

[26] Ge M, Wang YC, Liu YH, et al. The NIN-like protein 5 (ZmNLP5) transcription factor is involved in modulating the nitrogen response in maize [J]. Plant J, 2020, 102(2): 353-368.

[27] Wei M, Zhang MQ, Sun JL, et al. PuHox52 promotes coordinated uptake of nitrate, phosphate, and iron under nitrogen deficiency in *Populus ussuriensis* [J]. J Integr Plant Biol, 2023, 65(3): 791-809.

[28] Konishi M, Yanagisawa S. Identification of a nitrate-responsive *cis*-element in the *Arabidopsis NIR1* promoter defines the presence of multiple *cis*-regulatory elements for nitrogen response [J]. Plant J, 2010, 63(2): 269-282.

[29] 曹雄军, 卢晓鹏, 熊江, 等. 枳NLP转录因子响应干旱胁迫并与NRE顺式作用元件互作 [J]. 中国农业科学, 2018, 51(17): 3370-3378.
Cao XJ, Lu XP, Xiong J, et al. The *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.NIN-like protein transcription factors responses to drought stress and bind the nitrate-responsive *cis*-element [J]. Sci Agric Sin, 2018, 51(17): 3370-3378.

[30] Konishi M, Yanagisawa S. Roles of the transcriptional regulation mediated by the nitrate-responsive *cis*-element in higher plants [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 411(4): 708-713.

[31] Warning HO, Hachtel W. Functional analysis of a nitrite reductase promoter from birch in transgenic tobacco [J]. Plant Sci, 2000, 155(2): 141-151.

[32] Sander L, Jensen PE, Back LF, et al. Structure and expression of a nitrite reductase gene from bean (*Phaseolus vulgaris*) and promoter analysis in transgenic tobacco [J]. Plant Mol Biol, 1995, 27(1): 165-177.

[33] Zhang CY, Ye ZL, Qi LW, et al. Screening and functional evaluation of four *Larix kaempferi* promoters [J]. Plants, 2024, 13(19): 2777.

（责任编辑　高洁）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):230-239

贝莱斯芽胞杆菌MH24防控辣椒疫病及诱导辣椒转录组学的研究

李瑾琪[1,2] 姚经武[1] 袁勤峰[1] 刘瑜[3] 曹春霞[1] 尹飞虎[3*] 黄大野[1*]
(1.湖北省生物农药工程研究中心 国家生物农药工程技术研究中心,武汉 430064; 2.湖北工业大学生命科学与健康工程学院,武汉 430068; 3.新疆农垦科学院 农业农村部西北绿洲节水农业重点实验室,石河子 832000)

摘 要： 【目的】探究贝莱斯芽胞杆菌（*Bacillus velezensis*）MH24对辣椒疫病的防控效果及分子机制，为该菌株在生物防治领域的应用提供理论依据。【方法】通过离体与活体试验相结合探究菌株MH24抑菌活性及辣椒抗性机制。采用平板对峙、电镜观察及水解酶活性测定解析体外抑菌作用；通过盆栽试验验证活体防病效果；利用转录组测序筛选抗病差异基因，并结合RT-qPCR验证关键基因表达，揭示其抑菌及诱导植株抗病的分子机理。【结果】离体抑菌试验表明，MH24对辣椒疫霉（*Phytophthora capsici*）菌丝生长抑制率达75.64%，扫描电镜观察可见菌丝表面出现皱缩、断裂及塌陷等典型超微结构损伤，同时该菌株能高效分泌淀粉酶、蛋白酶等多种胞外水解酶。盆栽防效试验结果表明，MH24发酵液灌根处理能显著降低辣椒疫病病情指数，防效达88.23%。与对照组相比，MH24处理后辣椒叶片共鉴定出146个显著差异表达基因，其中114个上调表达，32个下调表达；这些差异基因主要富集于信号识别、信号传导、次生代谢及直接抗病四大功能模块，涉及LRR-RLK类受体激酶、MAPK级联信号通路组分以及PR-5家族病程相关蛋白等关键抗性基因。进一步抗性诱导试验证实，经MH24发酵液预处理的辣椒叶片在接种病原菌后病斑直径显著缩小，诱导防效达41.20%，进一步验证了该菌株激活植株防御反应的能力。【结论】贝莱斯芽胞杆菌MH24通过分泌抗菌活性物质及水解酶直接抑制病原菌生长，同时激活植株系统获得性抗性途径，实现对辣椒疫病的协同防控。

关键词： 贝莱斯芽胞杆菌；转录组分析；诱导抗性；辣椒疫霉；生防能力；实时荧光定量PCR；水解酶
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0097

Control of Pepper Blight by *Bacillus velezensis* MH24 and Induction of Pepper Transcriptomic Responses

LI Jin-qi[1,2] YAO Jing-wu[1] YUAN Qin-feng[1] LIU Yu[3] CAO Chun-xia[1] YIN Fei-hu[3*] HUANG Da-ye[1*]
(1. *Hubei Engineering Research Center of Biopesticide, National Engineering Research Center of Biopesticide, Wuhan* 430064; 2. *College of Life Science and Health Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan* 430068; 3. *Key Laboratory of Oasis Water-saving Agriculture in Northwest China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Sciences, Shihezi* 832000)

Abstract: 【Objective】This study aimed to evaluate the efficacy of *Bacillus velezensis* MH24 against pepper blight and to elucidate its molecular mechanism, thereby providing a theoretical basis for the application of this strain in biological control. 【Method】The antifungal activity and resistance mechanism of MH24 were investigated using both *in vitro* and *in vivo* approaches. *In vitro* antibacterial effects were assessed by plate confrontation assays, scanning electron microscopy (SEM), and hydrolytic enzyme activity assays. *In vivo* disease control efficacy was verified by pot experiments. Transcriptome sequencing was performed to identify differentially expressed genes (DEGs) related to disease resistance, and quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was used to validate the expression of key genes, thereby revealing the molecular mechanisms underlying antifungal activity and induced plant resistance. 【Result】*In vitro* assays showed that MH24 inhibited mycelial growth of *Phytophthora capsici* by 75.64%. SEM revealed typical ultrastructural damage, including mycelial shrinkage, breakage, and

收稿日期：2026-01-21
基金项目：湖北省农业微生物产业发展重大专项（NYWSWZX2025-2027-08），湖北省农业科技创新中心创新团队项目（2021-620-000-001-027）
*通信作者：黄大野 xiaohuangdaye@126.com，尹飞虎 nkyyfh@sohu.com

collapse. MH24 also efficiently secreted various extracellular hydrolytic enzymes, such as amylase and protease. Pot experiments demonstrated that root irrigation with MH24 fermentation broth significantly reduced the disease index of pepper blight, achieving a control efficacy of 88.23%. Compared with the control group, a total of 146 significantly DEGs were identified in pepper leaves after MH24 treatment, of which 114 were up-regulated and 32 down-regulated. These DEGs were mainly enriched in four functional modules: signal recognition, signal transduction, secondary metabolism, and direct disease resistance. Key resistance genes identified included LRR-RLK receptor-like kinases, MAPK cascade signaling pathway components, and PR-5 family pathogenesis-related proteins. Further resistance induction assays confirmed that pepper leaves pretreated with MH24 fermentation broth exhibited significantly reduced lesion diameters after pathogen inoculation, with an induced resistance efficacy of 41.20%, further validating the ability of this strain to activate plant defense responses.【Conclusion】*Bacillus velezensis* MH24 directly inhibits pathogen growth by secreting antimicrobial active substances and hydrolytic enzymes while simultaneously activating the plant systemic acquired resistance (SAR) pathway, thereby achieving synergistic control of pepper blight.

Keywords: *Bacillus velezensis*; transcriptome analysis; induced resistance; *Phytophthora capsici*; biocontrol ability; real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR); hydrolase

辣椒（*Capsicum annuum* L.）作为全球重要的经济作物与蔬菜品种，在种植过程中面临多种病害威胁，其中辣椒疫病由卵菌门疫霉属病原菌引起，主要致病种为辣椒疫霉（*Phytophthora capsici*），是制约其安全生产最具毁灭性的病害之一[1]。该病原菌利用一个发生基因截断的RxLR效应蛋白PcAvh337b，精准靶向了植物细胞内一个名为AtMBP-1的“感病因子”[2]。而其产生的卵孢子在土壤中蛰伏能力极强，可存活3年及以上。在温湿度适宜的环境下，会借助雨水飞溅、灌溉水流扩散，对辣椒植株进行全生育期侵袭。染病植株常出现根部腐烂、茎秆枯萎、果实软烂等症状。由于该病流行速度快、防治困难，常造成灾难性损失[3]。严重时田间减产幅度高达30%–80%，重病田整田绝收。每年给我国辣椒产业造成较大的经济损失[4]。

由于土传病害传播性强，宿主范围广，因此很难从源头进行治理。当前全球范围内针对植物土传病害的防控策略，其核心原则在于以预防为优先措施，同时将治疗作为补充手段。由于缺乏商业化的抗性品种，化学防治仍然是防控辣椒疫病的主要策略[4]。目前，有多种不同作用机理的杀菌剂被应用于此，主要包括苯酰胺类（如甲霜灵）、羧酸酰胺类和甲氧基丙烯酸酯类等。然而，随着这些药剂的频繁使用，辣椒疫霉菌已对其产生了广泛的抗药性。其中，曾因内吸活性强、防效优异而被广泛使用的苯酰胺类杀菌剂（如甲霜灵和精甲霜灵），在多地田间菌株中均检测到极高的抗性频率，导致其防治效果大幅降低，在实际生产中的应用已受到严重限制[5]。除了产生抗性外，化学防治剂还会破坏土壤自然肥力、残留农药难以降解，加剧环境污染与生态失衡，这也是其面临的严峻问题。生物防治因环境友好、可持续性强等优势成为研究热点，与传统的化学防治相比具有显著的绿色环保优势，其无污染特性在农业可持续发展中发挥着重要作用。在生物防治实践中，主要利用具有拮抗作用的微生物进行病害防控，其中常用的生防微生物包括细菌、真菌和放线菌三大类。在细菌类群中，贝莱斯芽胞杆菌（*B. velezensis*）凭借广谱抑菌活性备受关注，已有大量相关文献的报道。该类菌株可通过分泌抗菌物质[6–8]、竞争与定植[9–10]、诱导植物系统抗性[11]等多重机制防控病害，已在多种作物病害治理中展现应用潜力。例如贝莱斯芽胞杆菌XY40-1对辣椒疫病的防效达66.13%。C1B1菌株对辣椒白绢病的平板抑制率87.22%，盆栽防效44.4%。除辣椒土传病害外，贝莱斯芽胞杆菌对其他植物土传病害也有较强的防效。菌株JJYY对多种土传病害的防效在80.00%–87.74%之间，与化学药剂链霉素或噁霉灵无显著差异（$P>0.05$）[12–14]。贝莱斯芽胞杆菌MH24是从盐渍化土壤中筛选的一株生防菌株，菌株保藏编号CCTCC NO：M20221680，该菌株对多种植物病原菌具有良好的抑菌活性。

本研究通过MH24对辣椒疫霉菌的离体抑制效应验证其活体防控效果，以及采用转录组分析方法探究菌株MH24诱导辣椒抗病性的分子机制，阐明MH24防控辣椒疫病的机制，为开发新型生物农药及构建辣椒疫病绿色防控体系提供理论支撑与技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 供试生防细菌：贝莱斯芽胞杆菌MH24，由本实验室分离和保存。

供试病原真菌：辣椒疫霉菌（*P. capsici*），由本实验室分离和保存。

1.1.2 供试培养基 MH24发酵培养基（g/L）：红薯粉11、鱼粉12、酵母粉14、豆粕粉6、氯化镁0.5，pH 7.0。

淀粉培养基（g/L）：可溶性淀粉20.0、蛋白胨5.0、NaCl 5.0、牛肉膏3.0、琼脂粉15、蒸馏水1 L，pH 7.0。

CMC-N培养基（g/L）：羧甲基纤维素钠10.0、$NaNO_3$ 2、K_2HPO_4 1、$MgSO_4·7H_2O$ 0.5、KCl 0.5、$FeSO_4·7H_2O$ 0.01、琼脂粉15.0、蒸馏水1 L，pH 7.0。

葡聚糖培养基（g/L）：葡聚糖10.0、$NaNO_3$ 2.0、K_2HPO_4 1.0、$MgSO_4·7H_2O$ 0.5、KCl 0.5、$FeSO_4·7H_2O$ 0.01、琼脂粉15.0、蒸馏水1 L，pH 7.0。

蛋白质培养基（g/L）：脱脂奶粉10.0、NaCl 5.0、KH_2PO4 1.0、$MgSO_4·7H_2O$ 0.5、琼脂粉15.0-20.0、蒸馏水1 L，pH 7.0。

1.1.3 供试辣椒 辣椒品种为‘巨陇828’。

1.2 方法

1.2.1 离体抑菌活性 菌株MH24抑菌率的测定：参考田淼等[15]的方法，使用无菌打孔器（直径4 mm）在MH24菌株和病原真菌的菌落边缘打取菌饼，用于对峙培养。处理组：将菌株MH24的菌饼和病原真菌的菌饼分别接种至PDA平板（直径90 mm）上，二者之间的距离为45 mm。对照组只接种病原真菌。28 ℃恒温避光培养，每组3次重复。培养至对照组长满培养皿后测量菌落直径并计算菌丝生长抑制率。抑制率计算公式：

抑菌率（%）=（对照组菌落直径-处理组菌落直径）/（对照组菌落直径-菌饼直径）×100%

从对峙培养的平板中抑菌带边缘和对照菌落边缘挑取菌丝，在扫描电镜下观察菌丝形态并拍照，菌丝处理参考Liu等[16]的方法。

1.2.2 水解酶活性测定 使用水解圆圈法评估菌株的水解酶产生能力[17]。将菌株MH24分别接种在含有脱脂牛奶、羧甲基纤维素钠、CAS、β-1,3-葡聚糖和几丁质的琼脂平板上。25 ℃下培养3-5 d，观察是否在菌落周围形成水解圆圈。CMC-Na平板培养后需要用1%刚果红溶液覆盖平板染色30 min后倒掉染液，再将1 mol/L NaCl溶液覆盖平板脱色15 min。

1.2.3 菌株MH24防控辣椒疫病的活体盆栽试验 将辣椒种子使用1%（v/v）次氯酸钠浸泡5 min，随后用无菌水冲洗3次，30 ℃催芽露白后播种于32孔穴盘，基质为草炭：蛭石：珍珠岩=3∶1∶1（v∶v∶v），辣椒长至4叶期时进行试验。将辣椒疫霉从斜面活化至V8板，28 ℃培养7 d，随后使用无菌水冲洗平板，并用双蒸水浸没，光照培养10 d诱发游动孢子囊产生。将菌丝和孢子囊洗脱，双层灭菌纱布过滤，转至4 ℃冰箱放置30 min，然后室温放置30 min促进游动孢子释放。使用无菌水将孢子浓度调至$2×10^4$个/mL备用[18-19]。

MH24发酵液的制备：挑取MH24菌株孢子接种至100 mL种子培养基中，在30 ℃，180 r/min的摇床上培养36 h，得到种子液。将种子液按照5%（v/v）量接种至MH24发酵培养基中，30 ℃，180 r/min的摇床上培养36 h后得到发酵液。

盆栽试验设4个处理：（1）MH24 20倍处理组：MH24发酵液20倍稀释液灌根；（2）MH24 40倍处理组：MH24发酵液40倍稀释液灌根；（3）化学药剂处理组：烯酰吗啉500 μg/mL灌根；（4）空白对照：无菌水灌根。4个处理均为每株20 mL，试验共设置3个重复，每个重复16株。人工气候室培养3 d后在根部接种辣椒疫霉，接种量为每株1 mL，生长12 d后统计病情指数，并计算防效。

分级标准：0级，无症状；1级，叶子轻微萎蔫，茎部有黑色病变；2级，植株30%-49%发病；3级，植株50%-69%发病；4级，植株70%-89%发病；5级，植株死亡[20]。

病情指数=∑（各级植株数×级别）/（调查总株数×最高级别）×100

防治效果（%）=（对照病情指数-处理病情指数）/对照病情指数×100%。

1.2.4 菌株MH24诱导辣椒抗性的分子机制

（1）转录组测序。按照1.2.3试验方法将辣椒生长至4叶期时，处理组（MH24 20倍）在辣椒根部灌根20 mL上述菌剂稀释液，对照组（CK）添加20 mL无

菌水作为对照，每组共设置72株辣椒苗。生长8 d后，采集处理组和对照组同一叶位的叶片，每组采集12片，进行5次重复，共采集60片叶片，液氮速冻后于-80 ℃保存，运输至测序公司进行转录组测序。

（2）总RNA提取、转录组文库的构建和测序。通过R6827 Plant RNA Kit完成总RNA的提取，随后利用琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性及片段分布，同时使用Nanodrop进行纯度分析，并运用Qubit技术实现RNA浓度的精确测定。在确保RNA质量达标后，采用Oligo（dT）磁珠对mRNA进行特异性富集，继而实施片段化处理。随后，以mRNA为模板，用六碱基寡聚核苷酸的随机引物（random hexamers）合成第一条cDNA链，接着加入缓冲液、dNTPs、RNase H和DNA polymerase I合成第二条cDNA链，利用AMPure XP beads纯化cDNA；将纯化过后的双链cDNA再进行末端修复、加A尾并连接测序接头，然后用AMPure XP beads进行片段大小选择；最后通过PCR富集得到cDNA文库。文库质量检验通过后，依据有效浓度与预期数据产出量的要求，将各文库按比例混合并注入层流流动腔，经cBOT系统完成簇生成后，采用Illumina NovaSeq平台实施高通量测序分析。原始数据（raw reads）经Illumina测序平台高通量测序获得，以fastq的文件形式存储，测序得到的原始reads含有少量的低质量reads，不能直接用于组装和后续的信息分析，我们采用fastp软件进行数据质控过滤，得到clean reads后进行下一步分析。

（3）实时荧光定量PCR（RT-qPCR）验证。为了进一步验证转录组测序数据的准确性，选取7个差异表达基因进行RT-qPCR分析，并且选择*GAPDH*作为内参基因。引物相关信息见附表1。反应体系为：cDNA模板2 μL、正反向引物（10 μmol/L）各1 μL，PerfectStart® Green qPCR SuperMix（+Dye II）10 μL，补足ddH_2O至20 μL。反应程序：94 ℃ 2 min；94 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，45个循环；65–95 ℃，每个循环上升0.5 ℃，持续5 s。每个样品3次生物学重复（注：荧光定量PCR反应体系需在避光条件下配制，操作过程中必须戴好一次性手套）。

（4）活体盆栽诱导抗性验证。按照1.2.4（1）试验方法将辣椒生长至4叶期时，分别在辣椒根部灌根20 mL的上述菌剂稀释液（MH24 20倍，MH24 40倍）和20 mL无菌水作为处理组和对照组，每组共设置36株辣椒苗。生长8 d后，选取植株中部特定叶位的功能叶摘取36片，每组12片，共3组。在塑料盒底部铺设湿润的吸水纸，将整片叶片正面朝上平放其上，培养辣椒疫霉至适当菌龄后，用打孔器（直径5 mm）切取含菌丝的琼脂块，菌面朝下放置于叶片表面。加盖透明塑料盖以维持高湿度。培养2 d后用十字交叉法测量统计各处理组的菌斑直径，并计算防效。

1.2.5　数据分析　使用SPSS 26软件通过单因素方差分析（ANOVA）进行统计分析。数据显示为3个独立生物重复的平均值±标准差（SD）。

2　结果

2.1　MH24对辣椒疫霉的离体抑制效应及水解酶活性

2.1.1　离体抑菌活性　平板对峙培养7 d后，CK组中辣椒疫霉的菌落几乎覆盖整个9 cm直径的培养皿，其平均菌落直径达8.2 cm，菌丝致密且生长状态旺盛（图1-A）；而MH24处理组中，辣椒疫霉的生长受到明显抑制，其菌落仅在远离MH24接种点的局部区域呈稀疏扩展，平均菌落直径仅为2.3 cm（图1-B）。MH24对辣椒疫霉的抑菌率可达75.64%。表明MH24对辣椒疫霉具有良好的抑菌活性。

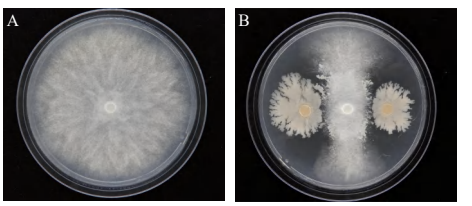
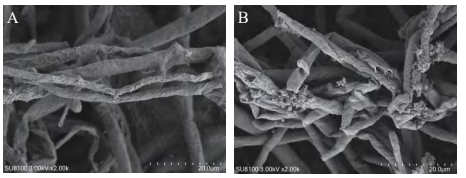


图1　辣椒疫霉单菌落CK组（A）与MH24处理组（B）

Fig. 1　Single colony of *Phytophthora capsici* in the CK group (A) and the MH24-treated group (B)

2.1.2　菌丝超微结构观察　扫描电镜观察结果显示，CK组辣椒疫霉菌丝形态完整，光滑。为典型的健康卵菌菌丝形态（图2-A）；而MH24对峙区域的辣椒疫霉菌丝形态发生显著的病理变化，出现皱缩、扭曲、结构破损，部分菌丝出现断裂、溶解现象（图2-B）。表明MH24对辣椒疫霉菌丝具有强烈破坏作用。



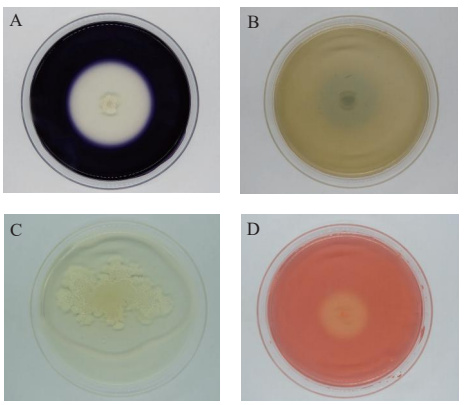
A:CK组;B:处理组

A: CK group. B: Treatment group

图2 MH24对辣椒疫霉菌丝作用的扫描电镜观察

Fig. 2 SEM observation of the effect of MH24 on mycelia of *Phytophthora capsici*

2.1.3 水解酶活性 经72 h培养后，菌株MH24在蛋白质、羧甲基纤维素、淀粉和β-1,3-葡聚糖培养基中菌落周围都有明显的水解圈（图3），证实了菌株MH24具有产生蛋白酶、β-1,3-葡聚糖酶、淀粉酶和纤维素酶的能力。几丁质和CAS培养基中菌落周围未产生水解圈，说明菌株MH24不能产生几丁质酶和铁载体。



A:淀粉培养基;B:β-1,3-葡聚糖培养基;C:蛋白质培养基;D:羧甲基纤维素培养基

A: Starch medium. B: β-1,3-glucan medium. C: Protein medium. D: Carboxymethyl cellulose medium

图3 MH24水解酶活性测定

Fig. 3 Assay of hydrolase activity of MH24

2.2 MH24防控辣椒疫病的盆栽效果

接种辣椒疫霉7 d后，各处理组的病情指数与防控效果如表1所示，灌根MH24后病情指数有明显降低，处理1组（MH24菌液20倍）病情指数为8.33，处理2组（MH24菌液40倍）病情指数为17.50，防控效果分别达到88.23%和75.30%。其中处理1组的防效与化学试剂组（烯酰吗啉500 μg/mL）相当。表明MH24对辣椒疫病具有显著的防控效果。

表1 MH24防控辣椒疫霉的盆栽效果

Table 1 Efficacy of strain MH24 against *Phytophthora capsici* in pot experiments

处理 Treatments	病情指数 Disease index	防效 Control effect (%)
MH24菌剂20倍 MH24 bioagent diluted 20 times	8.33±0.32c	88.23a
MH24菌剂40倍 MH24 bioagent diluted 40 times	17.50±0.20b	75.30c
烯酰吗啉 Dimethomorph (500 μg/mL)	8.33±0.17c	88.23a
对照 CK	70.83±0.51a	—

注:不同小写字母表示最小显著差法检测在0.05水平差异显著,下同

Note: Data with different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level based on the Least Significant Difference (LSD) test. The same below

2.3 接种菌株MH24对辣椒抗性诱导的转录组分析

2.3.1 RNA-seq数据质量统计与分析 经高通量测序分析，各样本的原始数据量介于31.48-42.27 Mb之间（表2）。经过数据过滤处理，有效读长范围达到31.31-42.08 Mb，其中Clean reads与Raw reads的比值超过99.46%。在测序质量评估中，Q20和Q30指标分别达到99.21%和95.29%以上，远高于RNA-seq的常规合格标准（Q20≥90%、Q30≥80%），测序碱基的准确性极强。同时样品与参考基因组比对时唯一分布的读长比例稳定在86.12%以上，多重比对读段占比仅约2%。此外，同一处理组内的生物学重复样本在各项指标上的波动幅度极小（如CK组总比对读段占比波动仅0.16%），反映出实验流程的稳定性与重复性良好。因此，RNA-seq结果可靠，适合进一步进行生物信息学分析。

2.3.2 差异表达基因分析 通过比较菌株MH24实验组（MH24）与对照样本（CK）的转录组数据，采用显著性水平（P_{adj}≤0.05）和表达量变化倍数（$|\log_2 FoldChange|>1$）作为筛选标准，共鉴定出146个显著差异表达基因。分析结果显示，在这些差异表达基因中，上调基因占比达78.08%（114个），而其余21.92%的基因（32个）呈现下调趋势（图4）。

通过对差异表达基因进行GO（gene ontology）功能富集分析，结果展示了显著富集的前20个功能

表 2　RNA-seq 数据质量分析

Table 2　Statistics of RNA-seq data quality

样品 Sample	原始读长 Raw reads number (bp)	过滤读长 Clean reads number (bp)	有效碱基数 Clean bases (G)	Q20 (%)	Q30 (%)	GC 含量 GC content (%)	总读段对数 Total read pairs
CK-1	41 389 232	41 212 371	12.19	99.34	96.45	42.81	41 212 371
CK-2	42 273 359	42 085 611	12.47	99.33	96.45	42.62	42 085 611
CK-3	36 156 617	35 989 458	10.65	99.37	96.71	42.60	35 989 458
MH24-1	39 076 275	38 873 625	11.52	99.34	96.46	42.59	38 873 625
MH24-2	31 481 578	31 312 465	9.26	99.21	96.93	42.52	31 312 465
MH24-3	41 502 293	41 310 245	12.22	99.32	96.29	42.58	41 310 245

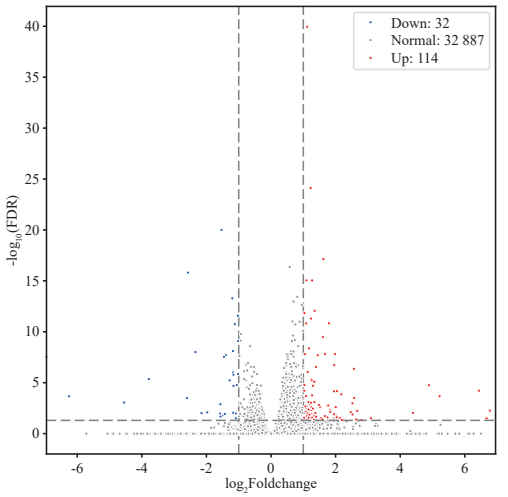


图 4　差异表达基因火山图

Fig. 4　Volcano plot of differentially expressed genes

条目（图 5-A）。结果表明，差异基因在生物过程中显著富集于脱落酸响应、乙醇响应、脂类响应、氧化胁迫响应、类黄酮生物合成过程调控等条目。其中，“脱落酸响应”“乙醇响应”相关条目对应的差异基因数量相对突出。对所有 DEGs 进行 KEGG 数据库富集分析，图 5-B 为 DEGs 显著富集的前 20 条通路。结果表明，DEGs 主要富集在植物激素信号转导（plant hormone signal transduction）、MAPK 信号通路–植物（MAPK signaling pathway-plant）、脂肪酸代谢（fatty acid metabolism）、植物–病原菌互作（plant-pathogen interaction）等通路中。其中植物激素信号转导通路的差异基因数量最多，结合 GO 富集结果可知，处理因素可能通过激素信号通路介导逆境响应与代谢过程的协同调控。

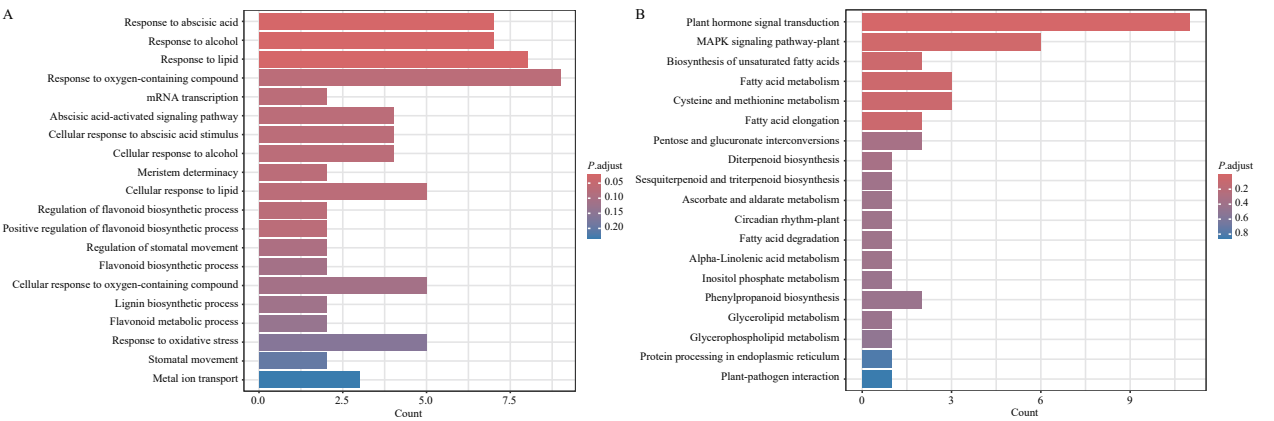


图 5　差异表达基因的 GO(A)和 KEGG(B)富集分析

Fig. 5　GO (A) and KEGG (B) enrichment analysis of differentially expressed genes

2.3.3　RT-qPCR 验证　为了验证 RNA-seq 数据的准确性，挑选了 7 个差异表达基因进行 RT-qPCR 验证。结果表明，这 7 个 DEGs 的表达趋势与 RNA-seq 的结果一致，*PAL*、*WRKY40* 均为上调表达，而 *LOX*、

NPR1、*GST*、*SOD*、*CAT*均为下调表达（图6），表明转录组的测序结果可靠。

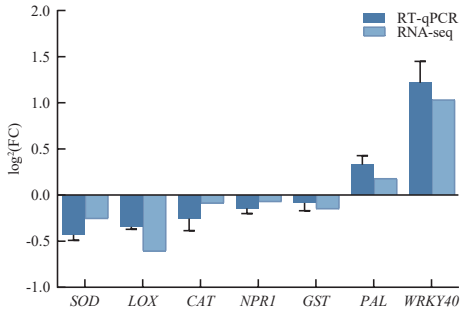


图6 RNA-seq和RT-qPCR基因表达结果比较

Fig. 6 Comparison of gene expression results between RNA-seq and RT-qPCR

2.3.4 与抗性诱导相关的DEGs 本研究通过转录组测序分析筛选获得114个显著上调DEGs（P_{adj} < 0.05），其平均log_2FC为1.706，其中22个基因呈高上调表达（log_2FC> 2），上调幅度范围为1.001−6.776，表明MH24菌株可显著激活辣椒体内多类基因的表达，为抗病性诱导提供转录水平支撑。

基于GO注释、KEGG通路分析及蛋白数据库（Swissprot、NR等）注释信息，114个上调DEG按“信号识别−信号传导−次生代谢−直接抗病”通路逻辑划分为4个功能模块。信号识别模块含10个基因（附表2），占比8.8%，平均log_2FC为1.555，核心基因为富含亮氨酸重复序列受体激酶（LRR-RLK，LOC107855892、LOC107849508、LOC107864260）、钙依赖蛋白激酶（CDPK，LOC107842605）及脱落酸受体*PYL*家族基因（LOC107853624、LOC107871127、LOC107843441、LOC124888049），其中LOC107871127的log_2FC为2.669、P_{adj}=7.51e-25，LRR-RLK受体激酶作为膜定位模式识别受体，负责识别微生物相关分子模式并启动PTI免疫。钙依赖蛋白激酶CDPK介导病原信号解码，将胞内Ca^{2+}的浓度波动转化为磷酸化信号，是连接早期识别与下游转录重新编辑的关键枢纽。而脱落酸受体PYL家族中LOC107871127表现极显著上调，表明ABA信号通路参与调控抗病反应。信号传导模块含59个基因（附表2），占比52.6%，平均log_2FC为1.817，核心基因包括MAPK级联反应组件（LOC124885852，log_2FC=6.440）及乙烯信号通路相关基因（LOC107855271、LOC107853805）、水杨酸信号通路相关基因（LOC107843885）、茉莉酸信号通路相关基因（LOC107845169），MAPK级联由MAPKKK-MAPKK-MAPK 3层激酶组成，通过顺序磷酸化将胞外信号放大传递至细胞核，LOC124885852的极端上调表明MH24菌株强烈激活了这一信号枢纽，其下游效应包括磷酸化激活转录因子、调控活性氧爆发、诱导植保素合成基因表达及调节细胞壁加固相关基因。次生代谢模块含2个基因（LOC107858874、LOC107857372），占比1.8%，平均log_2FC为1.622，分别编码5-表阿魏酸合酶与甲醇邻氨基苯甲酰转移酶，代表了苯丙烷代谢通路的关键节点。苯丙素生物合成是辣椒抗炭疽病的核心通路之一。其产物包括木质素、植保素和酚类化合物；直接抗病模块10个基因（附表2），占比8.8%，平均log_2FC为1.675，涵盖PR-5家族渗透蛋白（LOC107865680，log_2FC=2.576；LOC107865660，log_2FC=1.218）、ERF/WRKY/NAC家族转录因子（LOC107868079、LOC107861978、LOC107870355）及ABC转运蛋白（LOC107864851）。PR-5家族渗透蛋白属于病程相关蛋白，具有膜穿孔活性可直接破坏病原菌细胞膜，而ERF/WRKY/NAC转录因子作为下游调控节点进一步放大防御信号。ABC转运蛋白则可能参与植保素或抗菌物质的跨膜运输。

2.3.5 活体盆栽诱导抗性验证 接种辣椒疫霉2 d后，各处理组的病原菌病斑与防控效果如表3所示，灌根MH24后病斑直径有明显缩小，MH24菌液20倍处理的病原菌直径为1.57 cm，MH24菌液40倍处理组病原菌直径为2.30 cm，防控效果分别达到41.20%和13.86%。表明MH24能诱导辣椒对病原菌辣椒疫霉产生抗性。

3 讨论

本研究围绕生防菌株MH24防控辣椒疫病的潜力与机制展开系统探究，通过离体抑菌活性、菌丝破坏作用、水解酶分泌特性、活体盆栽诱导抗性验证，以及转录组水平的分子机制解析，逐步揭示MH24“直接抑菌+诱导系统抗性”的双重防控模式，为辣椒疫病的绿色生物防治提供了新的菌株资源与理论依据。

离体实验表明，MH24对辣椒疫霉菌丝生长具有

表3　MH24诱导辣椒抗性的盆栽验证

Table 3　Potted plant validation of MH24-induced resistance in chili plants

处理 Treatments	病原菌直径 Diameter of pathogenic bacteria（cm）	防效 Control effect（%）
MH24菌剂20倍 MH24 bioagent diluted 20 times	1.57±0.49c	41.20
MH24菌剂40倍 MH24 bioagent diluted 40 times	2.30±0.63b	13.86
对照CK	2.67±0.71a	—

显著抑制作用，电镜观察显示其可导致病原菌菌丝断裂、细胞膜损伤及内含物泄漏，与已报道的解淀粉芽胞杆菌HRH317[21]、枯草芽胞杆菌BS45[22]等生防芽胞杆菌的作用表型一致，这种直接破坏作用通常归因于菌株产生的抗菌代谢产物。进一步研究发现，MH24可高效分泌蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶和葡聚糖酶4类关键水解酶，其中纤维素酶与葡聚糖酶可靶向降解疫霉、镰刀菌等病原真菌细胞壁的核心多糖组分[23]，蛋白酶则能降解病原菌胞外蛋白类致病因子[24]，多酶协同的“细胞壁破坏–致病因子降解”作用是其直接抑菌效能的核心基础。盆栽防效试验证实，MH24预处理可降低辣椒发病率，初步证明其能预防辣椒疫病并诱导植株产生抗性[25-26]。而活体盆栽诱导抗性试验进一步验证了MH24的实际应用价值。数据充分证实其不仅能直接作用于病原菌，还可通过激活植物自身防御系统实现疫病防控。

为探究菌株MH24诱导辣椒抗病的分子机制，本研究采用转录组测序技术比较了MH24处理与对照辣椒叶片的基因表达谱，结果显示差异表达基因显著富集于“植物–病原互作”“苯丙烷生物合成”“MAPK信号通路”及“植物激素信号转导”等核心抗病通路，形成了“信号识别–信号传导–次生代谢–直接抗病”的完整诱导抗性分子通路。在信号识别层面，多个LRR类受体蛋白激酶基因表达量显著上调，其中LOC107864260表达量提升7倍以上，可能是辣椒识别MH24并启动防御反应的核心受体；推测LOC107849508（FERONIA-like）具备“细胞壁完整性感知”功能，其拟南芥同源基因*MEE39*可感知病原菌侵染导致的细胞壁损伤信号并激活下游防御[27-28]。此外，钙依赖性蛋白激酶基因LOC107856943和LOC107861687分别上调2.98倍和2.15倍，推测MH24定殖后可诱导胞内Ca^{2+}升高，激活CaM进而调控MAPK通路及过敏反应，这与荔枝霜疫霉效应子PlAvh222通过结合CaM抑制钙信号以阻断免疫的机制形成鲜明对比[29]。在防御效应层面，苯丙烷代谢、类黄酮及萜类合成相关基因的上调可促进酚类物质积累，增强细胞壁稳定性并清除活性氧[30-32]。在上调表达基因中发现，PR类蛋白中具有抗真菌活性的PR-1和通过破坏真菌细胞膜渗透性或作为内切-β-1,3-葡聚糖酶水解细胞壁葡聚糖，抑制病原菌生长的PR-5表达显著上调。通过干扰病原体细胞膜完整性或信号通路发挥作用[33]。它们能够抑制真菌的生长，可能通过干扰病原体的细胞膜完整性或信号通路来实现其防御作用。例如，在小麦中，水杨酸（SA）诱导的*TaPR1*基因被发现参与植物的抗病反应，这表明PR-1在防御病原体中起着重要作用[34-35]。除了PR类蛋白，本研究还发现了植物基因组中赋予植物对病原体抗性的*R*基因，通过产生R蛋白来实现这一功能[36]。R蛋白通过识别病原体无毒效应子（Avr），激活效应子触发的免疫反应（ETI）。当寄主*R*基因产物与病原体Avr产物相互识别时，植物产生抗性，引发比基础免疫（PTI）更快速、强烈的防御反应[37-38]。

基于上述研究结果，后续将开展应用转化相关工作，开展MH24菌剂的规模化发酵工艺优化与剂型研发，系统筛选最优碳氮源配比、发酵温度、pH及溶氧量等核心参数，建立低成本、高活菌数的液体发酵技术体系；开发适配不同施用场景的可湿性粉剂、悬浮剂及颗粒剂剂型，测定不同储存条件下的活菌数衰减规律，明确菌剂货架期与标准化储存技术要求。二是开展多生态区田间验证与应用技术规范制定，在辣椒主产区设置多点田间小区试验，测定不同施用方式、施用时期及施用剂量下的疫病防控效果、持效期及辣椒产量品质指标，最终形成可推广的MH24菌剂田间标准化使用技术规程。

4　结论

贝莱斯芽胞杆菌MH24对辣椒疫霉菌丝生长有强抑制作用，可致其菌丝结构损伤。且能有效防控

辣椒疫病。该菌株显著调控辣椒叶片基因表达，差异基因富集于信号识别、信号传导、次生代谢及直接抗病4大模块，涉及LRR-RLK、CDPK、MAPK、PR-1、PR-5等关键元件。MH24通过“直接拮抗+诱导抗性”途径协同防控辣椒疫病，是具有开发潜力的生防菌株。

文章所有附表数据请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260601163016_NewsFile_37.pdf）。

参考文献

[1] Quesada-Ocampo LM, Parada-Rojas CH, Hansen Z, et al. *Phytophthora capsici*: recent progress on fundamental biology and disease management 100 years after its description [J]. Annu Rev Phytopathol, 2023, 61: 185-208.

[2] Tian S, Peng Q, Du XR, et al. *Phytophthora* effector exploits WY module truncation to manipulate Nt-acetylation-mediated AtMBP-1 turnover and suppress plant immunity [J]. Sci Adv, 2025, 11(50): eady1482.

[3] Bowers JH. Effect of soil temperature and soil-water matric potential on the survival of *Phytophthora capsici* in natural soil [J]. Plant Dis, 1990, 74(10): 771.

[4] 王锐, 张正海, 曹亚从, 等. 辣椒疫病的发生规律及综合防治技术 [J]. 辣椒杂志, 2025, 23(4): 12-21.
Wang R, Zhang ZH, Cao YC, et al. The occurrence pattern and comprehensive control technology of *Phytophthora blight* in pepper [J]. J China Capsicum, 2025, 23(4): 12-21.

[5] 黄大野, 余志斌, 杜公福, 等. 淡紫褐链霉菌NBF715防控辣椒疫病研究 [J]. 北方园艺, 2022(17): 51-56.
Huang DY, Yu ZB, Du GF, et al. Control effect of *Streptomyces enissocaesilis* NBF715 on *Phytophthora blight* of pepper [J]. North Hortic, 2022(17): 51-56.

[6] Peng YX, Zhou C, Qiu FY, et al. Acid-resistant *Bacillus velezensis* effectively controls pathogenic *Colletotrichum capsici*and improves plant health through metabolic interactions [J]. Appl Environ Microbiol, 2025, 91(7): e00340-e00325.

[7] 穆晓清, 鲁耀雄, 戴良英, 等. 贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1对辣椒疫霉的抑菌效果及其抑菌物质 [J]. 农业生物技术学报, 2024, 32(4): 859-872.
Mu XQ, Lu YX, Dai LY, et al. Antibacterial effect of *Bacillus velezensis* YFB3-1 on *Phytophthora capsici* and its antibacterial substances [J]. J Agric Biotechnol, 2024, 32(4): 859-872.

[8] Ma S, Wang YJ, Teng W. *Bacillus velezensis* K-9 as a potential biocontrol agent for managing potato scab [J]. Plant Dis, 2023, 107(12): 3943-3951.

[9] Wang ZQ, Zhao YK, Shao JH, et al. Rhizosphere domestication enhances root colonization and plant growth promotion performance of *Bacillus velezensis* SQR9 [J]. Front Microbiol, 2025, 16: 1638130.

[10] 司方洁, 任金瑶, 黄涛祥, 等. 贝莱斯芽孢杆菌5YN8生物被膜在防治番茄灰霉病过程中的功能研究 [J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(5): 1223-1230.
Si FJ, Ren JY, Huang TX, et al. The function of *Bacillus velezensis* 5YN8 biofilm in controlling of *Botrytis cinerea* in tomato [J]. Chin J Biol Control, 2022, 38(5): 1223-1230.

[11] 祝文慧, 秦溥, 赵岩, 等. 两种芽孢杆菌对苗期土传辣椒疫病的防控作用 [J]. 中国生物防治学报, 2023, 39(5): 1235-1243.
Zhu WH, Qin P, Zhao Y, et al. Prevention and control effect of two *Bacillus strains* on soil-borne *Phytophthora capsici* in seedling stage [J]. Chin J Biol Control, 2023, 39(5): 1235-1243.

[12] 周池, 周诗晶, 陶禹, 等. 贝莱斯芽孢杆菌XY40-1: 全基因组特征分析及对辣椒疫病的生物防治效果评价 [J]. 微生物学报, 2024, 64(12): 4882-4901.
Zhou C, Zhou SJ, Tao Y, et al. *Bacillus velezensis* XY40-1: whole genomic characteristics and biocontrol effects on pepper *Phytophthora* blight [J]. Acta Microbiol Sin, 2024, 64(12): 4882-4901.

[13] 王芳, 宁丽平, 邓稳桥, 等. 贝莱斯芽孢杆菌C1B1生防活性及促生作用研究 [J]. 中国生物防治学报, 2024, 40(4): 948-957.
Wang F, Ning LP, Deng WQ, et al. Biocontrol activity and growth promoting effect of *Bacillus velezensis* C1B1 [J]. Chin J Biol Control, 2024, 40(4): 948-957.

[14] 王麒, 许婧霞, 张亚妮, 等. 贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) JJYY防控土传病害效果评价及其全基因组测序分析和抗菌成分鉴定 [J]. 微生物学通报, 2024, 51(1): 155-171.
Wang Q, Xu JX, Zhang YN, et al. *Bacillus velezensis* JJYY against soil-borne diseases: biocontrol effect, whole genome sequencing, and antimicrobial components [J]. Microbiol China, 2024, 51(1): 155-171.

[15] 田淼, 彭玉飞, 吕红, 等. 非洲哈茨木霉LMNS-M9的鉴定、生物学特性及其对藜麦的促生作用 [J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3848-3865.
Tian M, Peng YF, Lü H, et al. *Trichoderma* afroharzianum LMNS-M9: identification, biological characteristics, and growth-promoting effect on quinoa [J]. Microbiol China, 2023, 50(9): 3848-3865.

[16] Liu Y, Yao SX, Deng LL, et al. Different mechanisms of action of isolated epiphytic yeasts against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* on *Citrus* fruit [J]. Postharvest Biol Technol, 2019, 152: 100-110.

[17] Sang MK, Chun SC, Kim KD. Biological control of *Phytophthora blight* of pepper by antagonistic rhizobacteria selected from a sequential screening procedure [J]. Biol Control, 2008, 46(3): 424-433.

[18] Chemeltorit PP, Mutaqin KH, Widodo W. Combining *Trichoderma hamatum* THSW13 and *Pseudomonas aeruginosa* BJ10-86: a synergistic chili pepper seed treatment for *Phytophthora capsici* infested soil [J]. Eur J Plant Pathol, 2017, 147(1): 157-166.

[19] Yang MM, Xu LP, Xue QY, et al. Screening potential bacterial biocontrol agents towards *Phytophthora capsici* in pepper [J]. Eur J Plant Pathol, 2012, 134(4): 811-820.

[20] 赵欣, 郝林. 解淀粉芽孢杆菌HRH317对串珠镰孢菌菌丝形态和超微结构的影响 [J]. 植物保护学报, 2020, 47(1): 110-118.
Zhao X, Hao L. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* HRH317 on mycelial morphology and ultrastructure of *Fusarium moniliforme* [J]. J Plant Prot, 2020, 47(1): 110-118.

[21] Lu ZY, Chen ML, Long XY, et al. Biological potential of *Bacillus subtilis* BS45 to inhibit the growth of *Fusarium graminearum* through oxidative damage and perturbing related protein synthesis [J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1064838.

[22] Haq IU, Kennedy P, Schreiner KM, et al. Gene expression by a model fungus in the ascomycota provides insight into the decay of fungal necromass [J]. Environ Microbiol, 2024, 26(12): e70006.

[23] Podder S, Saha D, Ghosh TC. Deciphering the intrinsic properties of fungal proteases in optimizing phytopathogenic interaction [J]. Gene, 2019, 711: 143934.

[24] Xiong XP, Sun SC, Zhang XY, et al. GhWRKY70D13 regulates resistance to *Verticillium dahliae* in cotton through the ethylene and jasmonic acid signaling pathways [J]. Front Plant Sci, 2020 (11): 69.

[25] 韩威山, 张江一, 方菲菲, 等. 辣椒疫霉致病、抗病和生物防治的分子机制研究进展 [J]. 北方园艺, 2025(10): 118-125.
Han WS, Zhang JY, Fang FF, et al. Research progress on the molecular mechanism of pathogenesis, disease resistant and biological control of *Phytophthora capsici* [J]. North Hortic, 2025 (10): 118-125.

[26] Man J, Gallagher JP, Bartlett M. Structural evolution drives diversification of the large *LRR-RLK* gene family [J]. New Phytol, 2020, 226(5): 1492-1505.

[27] Van der Does D, Boutrot F, Engelsdorf T, et al. The *Arabidopsis* Leucine-rich repeat receptor kinase MIK2/LRR-KISS connects cell wall integrity sensing, root growth and response to abiotic and biotic stresses [J]. PLoS Genet, 2017, 13(6): e1006832.

[28] Li P, Xie LZ, Li W, et al. An oomycete effector targets host calmodulin to suppress plant immunity [J]. Plant J, 2025, 123(5): e70457.

[29] Bhagat N, Mansotra R, Patel K, et al. Molecular warfare between pathogenic *Fusarium oxysporum* R1 and host *Crocus sativus* L. unraveled by dual transcriptomics [J]. Plant Cell Rep, 2024, 43 (2): 42.

[30] Jia CP, Guo B, Wang BK, et al. Integrated metabolomic and transcriptomic analysis reveals the role of phenylpropanoid biosynthesis pathway in tomato roots during salt stress [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 1023696.

[31] Lee SH, Park YJ, Park SU, et al. Expression of genes related to phenylpropanoid biosynthesis in different organs of *Ixeris dentata* var. *albiflora* [J]. Molecules, 2017, 22(6): 901.

[32] Han Z, Schneiter R. Dual functionality of pathogenesis-related proteins: defensive role in plants versus immunosuppressive role in pathogens [J]. Front Plant Sci, 2024, 15: 1368467.

[33] Kaur A, Kaur S, Kaur A, et al. Pathogenesis-related proteins and their transgenic expression for developing disease-resistant crops: strategies progress and challenges [M]//Case Studies of Breeding Strategies in Major Plant Species. London: IntechOpen, 2023.

[34] Wang F, Shen SS, Zhao CP, et al. TaPR1 interacts with TaTLP1 via the αIV helix to be involved in wheat defense to *Puccinia triticina* through the CAPE1 motif [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 874654.

[35] Wang Q, Li MG, Lu M, et al. Expression analysis of pathogenesis-related protein genes revealed the key RrPRs involved in SA- and MeJA-mediated top-rot disease resistance in *Rosa roxburghii* fruit [J]. Physiol Mol Plant Pathol, 2024, 133: 102345.

[36] Guidetti-Gonzalez S, Carrer H. Putative resistance genes in the CitEST database [J]. Genet Mol Biol, 2007, 30(3 suppl): 931-942.

[37] Tailor A, Bhatla SC. R gene-mediated resistance in the management of plant diseases [J]. J Plant Biochem Biotechnol, 2024, 33(1): 5-23.

[38] Nabi Z, Manzoor S, Nabi SU, et al. Pattern-Triggered Immunity and Effector-Triggered Immunity: crosstalk and cooperation of PRR and NLR-mediated plant defense pathways during host-pathogen interactions [J]. Physiol Mol Biol Plants, 2024, 30(4): 587-604.

（责任编辑　高洁）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):240-251

月季病原真菌鉴定及青岛假单胞菌BYX7生防潜力研究

张愈甜[1] 王怡[2] 王子阳[3] 付曼青[2] 吴鹏宇[2*]
（1.南阳理工学院张仲景国医国药学院，南阳 473000；2.南阳理工学院生物与化学工程学院，南阳 473000；3.广西大学轻工与食品工程学院，南宁 530004）

摘 要： 【目的】探究南阳月季产区病原真菌种类及青岛假单胞菌BYX7的生防潜力与应用价值，为月季真菌病害绿色防控提供菌株资源与技术支撑。【方法】采用组织分离法从南阳月季病叶及茎段中分离病原真菌，结合形态学特征与ITS分子生物学技术进行鉴定；通过平板对峙法筛选拮抗菌并分析其抑菌谱；采用透明圈法、比色法、无氮培养基接种法、CAS培养基法分别检测目标菌株的产酶、解磷、固氮、产铁载体及IAA合成能力；运用单因素试验与响应面法优化菌株高密度发酵条件；通过载体与保护剂筛选制备微生物菌粉；采用盆栽试验评价菌剂对月季褐斑病的防控效果。【结果】分离鉴定出8种对月季具有致病性的真菌，其中隐秘刺盘孢菌为优势病原菌；青岛假单胞菌BYX7对8种病原菌的抑制率为50%-99%，兼具尿素酶、纤维素酶活性，可产12.40 mg/L IAA，且具有产铁载体、溶磷（将1 g/L无机磷降至10.1 mg/L）和固氮能力；优化后的发酵条件为木糖20 g/L、鱼蛋白胨20 g/L、K_2HPO_4 1 g/L、初始pH 7.5、33 ℃、179 r/min，菌体浓度达2.71×10^{10} CFU/mL（较优化前提高22倍）；以沸石粉为载体、海藻糖为保护剂制备的菌粉活菌数1.60×10^{8} CFU/g，存活率66.46%，对月季褐斑病的盆栽防治指数达38.61%。【结论】青岛假单胞菌BYX7兼具广谱抑菌活性与多重促生功能，其优化后的高密度发酵工艺及微生物菌剂制备技术可行，对月季褐斑病具有良好防控效果，可作为月季真菌病害绿色防控的优质菌株资源。

关键词： 月季褐斑病；微生物防治；青岛假单胞菌BYX7；拮抗作用；促生特性；高密度发酵；菌剂制备；盆栽防效
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0073

Identification of Pathogenic Fungi on *Rosa chinensis* and Biocontrol Potential of *Pseudomonas qingdaonensis* BYX7

ZHANG Yu-tian[1] WANG Yi[2] WANG Zi-yang[3] FU Man-qing[2] WU Peng-yu[2*]
（1. *Zhang Zhongjing School of Chinese Medicine, Nanyang Institute of Technology, Nanyang* 473000; 2. *School of Biological and Chemical Engineering, Nanyang Institute of Technology, Nanyang* 473000; 3. *College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning* 530004）

Abstract: 【Objective】 This study aimed to identify the pathogenic fungi associated with rose production areas in Nanyang and to evaluate the biocontrol potential and application value of *Pseudomonas qingdaonensis* BYX7, thereby providing strain resources and technical support for the green control of rose fungal diseases. 【Method】 Pathogenic fungi were isolated from diseased leaves and stems of roses in Nanyang using the tissue isolation method and were identified based on morphological characteristics and ITS molecular analysis. Antagonistic bacteria were screened by plate confrontation assays, and their inhibition spectra were determined. The enzyme production, phosphate solubilization, nitrogen fixation, siderophore production, and IAA synthesis ability of the target strain were assessed using the transparent zone method, colorimetric assays, nitrogen-free medium inoculation, and the CAS medium method, respectively. High-density fermentation conditions were optimized through single-factor experiments followed by response surface methodology. Microbial powder was prepared by screening suitable carriers and protectants. The control efficacy of the microbial agent against rose brown spot disease was evaluated in pot experiments.

收稿日期：2026-01-18
基金项目：河南省自然科学基金青年项目（252300423831），河南省科技攻关项目（242102310498），河南省高等学校重点科研项目（24A350008），南阳理工学院博士启动基金（NGBJ-2023-03）
*通信作者：吴鹏宇 3131073@nyist.edu.cn

【Result】Eight pathogenic fungi were isolated and identified, among which *Colletotrichum aenigma* was the dominant pathogen. *Pseudomonas qingdaonensis* BYX7 exhibited inhibition rates of 50%−99% against the eight pathogens. The strain possessed urease and cellulase activities, produced 12.40 mg/L IAA and siderophores, and showed phosphate-solubilizing capacity (reducing 1 g/L inorganic phosphorus to 10.1 mg/L) as well as nitrogen-fixing ability. Under optimized fermentation conditions (xylose 20 g/L, fish peptone 20 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, initial pH 7.5, 33 ℃, 179 r/min), the cell concentration reached 2.71×10^{10} CFU/mL, representing a 22-fold increase compared to pre-optimization levels. The microbial powder prepared with zeolite powder as carrier and trehalose as protectant had a viable cell count of 1.60×10^{8} CFU/g and a survival rate of 66.46%, and achieved a control efficacy of 38.61% against rose brown spot disease in pot experiments.【Conclusion】*Pseudomonas qingdaonensis* BYX7 possesses broad-spectrum antifungal activity and multiple plant growth-promoting traits. The optimized high-density fermentation process and microbial agent preparation technology are feasible, and the strain shows promising control efficacy against rose brown spot disease. Therefore, it represents a valuable strain resource for the green control of rose fungal diseases.

Keywords: *Rose* brown spot disease; microbial control; *Pseudomonas qingdaonensis* BYX7; antagonistic activity; growth-promoting characteristics; high-density fermentation; microbial agent preparation; pot control efficacy

月季（*Rosa×hybrida*）为世界四大切花之一，隶属蔷薇科蔷薇属多年生木本植物[1]。因观赏价值高、适应性强等特点，月季成为园林绿化与花卉产业的核心经济作物，在全球园艺市场中占据重要地位。但规模化栽培中，黑斑病、炭疽病等多种真菌病害频发，导致植株长势衰弱、观赏品质下降，严重制约月季产业高质量可持续发展[1-2]。当前月季病害防控以化学农药为主，长期大量施用易引发病原菌抗药性、农药残留及生态环境破坏等问题，与现代农业绿色发展理念相悖。因此，开展月季病原真菌精准鉴定与新型绿色生防技术研发，对推动花卉产业生态化转型、保障产业效益与生态安全具有重要实践意义。

明确病原种类是植物病害高效防控的核心前提，也是制定针对性防控策略的基础。近年来，国内外学者已针对月季病害病原开展研究。贾静怡等[1]在北京市月季产区鉴定出丽赤壳褐斑病病原菌，李艳杰[2]对昆明地区月季黑斑病病原菌进行了分离与防治初探。但不同产区气候、栽培模式差异显著，致病真菌种类呈现明显地域性特征，优势病原菌尚不明确。南阳作为我国月季主产区，栽培面积广、品种丰富，但其区域内月季真菌病害的病原种类、优势菌群及致病性特征尚未被系统解析，导致防控措施缺乏针对性，难以实现精准绿色防控。

在生物防治领域，假单胞菌属（*Pseudomonas*）因根部定殖能力强、拮抗谱广、促生功能多样等特点，成为生防微生物的核心类群[3-4]。近年来相关研究持续深入，Purtschert-Montenegro等[5]发现恶臭假单胞菌（*P. putida*）可通过IVB型分泌系统保护番茄免受青枯菌侵害，田洁等[6]证实该菌株能改善光合作用、促进菊花插穗生长；赵子璇等[7]报道防御假单胞菌（*P. protegens*）ZF509含4种抑菌物质合成基因，对多种病原微生物具有显著拮抗作用；李潇潇等[8]综述了荧光假单胞菌（*P. fluorescens*）通过产抗生素、铁载体等机制实现病害防控与植物促生的双重功能。这些研究为假单胞菌在植物病害防控中的应用提供了重要支撑，但多聚焦于已知生防菌株的机制解析，新型高效菌株的挖掘与应用仍显不足[9-11]。

青岛假单胞菌（*P. qingdaonensis*）是假单胞菌属中近年新报道的类群，现有研究多集中于植物促生、土壤重金属污染修复及非生物胁迫缓解等方面[9-11]，如Chlebek等[10]发现其具有重金属抗性与烃类降解能力，Zainurin等[11]证实其与硅协同可缓解水稻干旱胁迫，但该菌株在植物病原真菌拮抗及月季病害生防领域的研究尚未见报道，生防资源价值亟待挖掘。

针对南阳月季主产区病原真菌种类与优势菌群不明、现有生防菌株多为传统类群而新型资源稀缺、青岛假单胞菌生防潜力未被开发等突出问题，本研究以南阳月季种植基地为研究区域，系统分离鉴定当地致病真菌并明确优势病原菌，筛选出对其具有强拮抗作用的青岛假单胞菌BYX7，解析其抑菌谱与多重促生特性，优化该菌株的高密度发酵条件与菌剂制备工艺，同时通过盆栽实验验证菌剂对月季褐斑病的防控效果，以期丰富月季病害病原数据库与生防菌株资源库，拓展青岛假单胞菌的应用领域，

为月季真菌病害绿色防控提供全新技术方案。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 月季病害样本 于2023年4–10月，在南阳露天月季种植基地（112°36′40.6″E，33°06′26.1″N）采集呈现黑斑、发霉等典型症状的月季叶片及茎段样本。

1.1.2 供试细菌(拮抗菌) 8株拮抗细菌分离自月季的根际土壤，现保藏于河南省工业微生物菌种保藏工程研究中心。其信息如表1所示。

表1 拮抗微生物种类

Table 1 Antagonistic microbial species

编号 Number	名称 Name	保藏编号 Preservation number
BYXC5	日本假黄单胞菌 *Pseudoxanthomonas japonensis*	2021060102
BYX7	青岛假单胞菌 *P. qingdaonensis*	2021060105
BYX1E	边缘假单胞菌 *P. marginalis*	2021060112
BYX5	空气芽胞杆菌 *Bacillus aerius*	2021060123
BYXB	海口芽胞杆菌 *B. haikouensis*	2021060124
BYXF	托拉氏假单胞菌 *P. tolaasii*	2021060502
BYX1J	摩氏假单胞菌 *P. mosselii*	2021060504
BYXD2	克氏假单胞菌 *P. knackmussii*	2021060522

1.1.3 培养基及试剂 本试验共使用9种培养基和2种试剂。其中PDA培养基用于供试病原真菌的分离、纯化及常规培养；LB培养基用于生防细菌的活化与常规培养；尿素酶琼脂基础培养基、CMC培养基、无机磷培养基、CAS培养基、Ashby无氮培养基，依次用于供试菌株的尿素酶活性、纤维素降解能力、解磷能力、嗜铁素产生能力及固氮能力的检测；King培养基用于诱导促生菌合成分泌IAA；基础发酵培养基用于生防菌的高密度发酵。Spot比色液和S2比色液用于IAA的定性及定量检测。详细配方详见附表1。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离鉴定 参考张晓勇等[12]的方法，将病健交界处组织剪切、消毒、漂洗和晾干后接种至PDA固体培养基中分离培养及纯化；用试剂盒提取真菌基因组DNA并进行PCR扩增，扩增产物经电泳检测后送至武汉擎科生物科技有限公司测序，测序结果在NCBI数据库中比对，利用MEGA 4软件采用邻近法（neighbor-joining）构建系统发育树。

1.2.2 致病性测定 病原菌的致病性测定选用刺伤接种法[13]进行。采集月季叶片经消毒后，用无菌刀片在叶片中心划伤，加入40 μL浓度为1×10^6个/mL的病原菌孢子悬浮液，以等体积无菌水作为对照组，每个处理重复3次。放入培养箱中培养，24 h后吸去孢子悬浮液，补加无菌水继续培养。7 d后观察并记录叶片发病情况，进行病情统计。

1.2.3 对植物病原真菌抑制能力测定 采用黄丽等[14]的方法，首先测定8种拮抗菌对隐秘刺盘孢菌BYZ1的抑制能力，计算抑菌率并分析抑菌效果，进而测定拮抗菌对其他病原真菌的抑制能力。

1.2.4 产酶能力测定 参考张嘉馨[15]的方法检测尿素酶活性；参考贾金姗等[16]的方法检测纤维素酶活性。各组均设置3次重复。

1.2.5 促生特性研究 参考王瑞琪等[17]的方法定性检测解磷能力；参考Lucero等[18]的方法进行溶磷的定量检测；参考聂丽妍[19]的方法检测固氮和铁载体产生能力；参考蒋鑫[20]的方法，进行IAA定性、定量检测。各组均设置3次重复。

1.2.6 发酵培养基的优化

（1）生长曲线的测定。参考杨瑾等[13]的方法，绘制BYX7的生长曲线。

（2）培养基组分的优化。基于基础发酵培养基，通过稀释平板计数法考察发酵培养基中最佳碳源（糖蜜、葡萄糖、果糖、麦芽糖、淀粉、玉米粉、蔗糖、麸皮、木糖、大米粉、乳糖、玉米淀粉）及浓度（5、10、15、20、25、30、35、40 g/L）、氮源（酵母浸粉、花生饼粉、蛋白胨、牛肉膏、鱼蛋白胨、玉米浆干粉、黄豆饼粉、尿素）及浓度（5、10、15、20、25、30、35、40 g/L）、无机盐（K_2HPO_4、$MnCl_2$、$MgSO_4$、$ZnSO_4$、$FeSO_4$、$CuSO_4$、$CaCl_2$）对青岛假单胞菌BYX7活菌数的影响，以确定最佳培养基组分。

（3）发酵条件的优化。基于上述优化后的培养基配方，再分别考察初始pH（5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5）、摇床转速（160、180、200、220 r/min）、发酵温度（31、33、35、37、39 ℃）对

BYX7活菌数的影响，以确定最佳发酵培养条件。

（4）发酵条件的Box-Behnken响应面法优化。以活菌数为响应量，从A-温度（31−35 ℃）、B-转速（160−200 r/min）、C-pH（7−8）影响因素中根据Box−Behnken设计法，运用软件Design Expert 13对其进行3因素3水平的优化试验设计（表2）。

表2　Box-Behnken试验设计

Table 2　Box-Behnken experimental design

编号 Symbol	因素 Factor	编码水平 Coded levels		
		-1	0	+1
A	温度 Temperature（℃）	31	33	35
B	转速 Speed（r/min）	160	180	200
C	pH	7	7.5	8

1.2.7　微生物菌剂的制备

（1）最佳吸附载体的筛选。根据表3将100 mL菌液离心所得菌泥与不同载体（麸皮、木屑、玉米芯粉、活性炭、硅藻土、沸石粉）混匀并干燥。同时取干燥前菌剂于100 mL无菌水中摇匀（表3），通过稀释平板计数法记录干燥前活菌数。根据表3将菌剂干燥至不同时间（使其最终含水量约为10%），取干燥后的菌粉1 g（干燥前后菌粉干重相同）于100 mL无菌水中摇匀，通过稀释平板计数法记录干燥后活菌数。根据公式计算菌体存活率（I_b），从而确定最佳吸附载体。

$I_b=S_1/S_0\times 100\%$

其中，S_0：干燥前活菌数（CFU/mL）；S_1：干燥后活菌数（CFU/mL）。

（2）最佳保护剂的筛选。参考上述方法，将菌泥、最佳吸附载体和10 g保护剂（海藻糖、壳聚糖、山梨醇、葡聚糖、甘露醇、甘油、环糊精）混匀并干燥。通过稀释平板计数法记录活菌数，计算菌体存活率，从而确定最佳保护剂。

表3　不同载体的初始添加比例及干燥参数

Table 3　Initial addition ratios of different carriers and their corresponding drying parameters

载体种类 Type of adsorption carrier	载体质量 Carrier quality（g）	生理盐水 Sodium chloride solution（mL）	干燥时间 Drying time（min）	干燥前质量 The mass before drying（g）	干燥后质量 The mass after drying（g）
活性炭 Activated carbon	5	4.7	60	1.79	1
木屑 Sawdust	8	6.0	65	1.57	1
硅藻土 Diatomaceous earth	4	5.0	50	2.00	1
玉米芯粉 Corn cob powder	2	7.0	90	4.13	1
沸石粉 Zeolite powder	9	4.0	45	1.32	1
麸皮 Bran	3	5.0	65	2.52	1

1.2.8　盆栽实验　参考郑运祥等[21]的实验方法，选取现代月季栽培品种‘粉扇’（*Rosa*×*hybrida* ‘Fenshan’）作为供试植物，并选用隐秘刺盘孢菌（*C. aenigma*）进行接种实验。（1）采用浇灌法将BYX7发酵液接种到月季植株，以评估其对月季的潜在致病性。（2）制备浓度为1×10^6个/mL的病原菌孢子悬浮液，取10.0 g菌粉样品加入到100 mL无菌水中混匀，得菌体浓度约为1.6×10^8 CFU/mL；（3）挑选生长情况一致的健康月季，分成两组，每组6株。对照组采用病原菌孢子悬浮液和无菌水交替浇灌，实验组采用病原菌孢子悬浮液和菌剂交替浇灌。整个实验独立重复3次。根据公式计算发病率。

发病率（%）=每株发病叶片/每株总叶片×100%

根据叶片发病率将月季褐斑病发病病情划分为0−4级共5个等级[22]，具体分级标准如下：0级为无病症，完全健康的植株；1级为发病率≤25%；2级为发病率在25%−50%；3级为发病率在50%−75%；4级为发病率在75%−100%，全株严重萎蔫以至枯死。最后，根据公式分别计算病情指数和防治指数。

病情指数（%）=∑（病级株数×相应病级数）/（植株总株数×最高等级）×100%

防治指数（%）=（对照病情指数−实验病情指数）/（对照病情指数）×100%

1.2.9　数据分析　采用MEGA 4、Microsoft Excel、

Design-Expert 13和Adobe Photoshop软件进行实验数据整理、统计分析和图形绘制，GraphPad Prism 9.5进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 病原菌的分离鉴定

从月季种植基地的发病茎叶样品中分离纯化得到8种不同形态的真菌（图1-A）。利用ITS1和ITS4引物对8株真菌进行PCR扩增后，将序列上传至GenBank数据库进行同源性比对，其对比结果如表4所示，并根据菌株ITS序列构建系统进化树（图1-B）。结合菌落形态特征和分子生物学鉴定结果最终确定菌株BYZ1为隐秘刺盘孢菌（*Colletotrichum aenigma*），BYZ2菌株为王氏葡萄孢菌（*Botryosphaeria wangensis*），BYZ3菌株为尖孢枝孢菌（*Cladosporium oxysporum*），BYZ4菌株为布氏镰刀菌（*Fusarium boothii*），BYZ5菌株为六出花链格孢菌（*Alternaria alstroemeriae*），BYZ6菌株为长镰刀菌（*Fusarium longifundum*），BYZ7菌株为柯比特刺盘孢菌（*Colletotrichum cobbittiense*），BYZ8菌株为藤仓镰刀菌（*Fusarium fujikuroi*）。

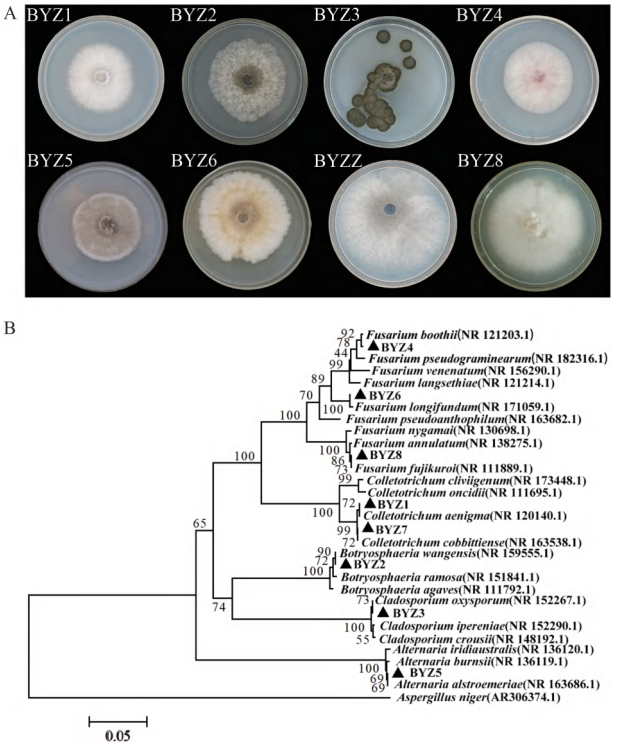


图1 病原真菌的菌落形态（A）及基于ITS序列构建的系统发育树（B）

Fig. 1 Colony morphology (A) of the pathogenic fungi and phylogenetic tree (B) based on ITS sequences

表4 病原真菌鉴定结果

Table 4 Identification of pathogenic fungi

编号 Number	菌株名称 Strain name	序列相似度 Similarity（%）	GenBank登录号 Accession number
BYZ1	*Colletotrichum aenigma*	100.00	NR 120140.1
BYZ2	*Botryosphaeria wangensis*	100.00	NR 159555.1
BYZ3	*Cladosporium oxysporum*	100.00	NR 152267.1
BYZ4	*Fusarium boothii*	99.81	NR 121203.1
BYZ5	*Alternaria alstroemeriae*	99.81	NR 163686.1
BYZ6	*Fusarium longifundum*	99.81	NR 171059.1
BYZ7	*Colletotrichum cobbittiense*	100.00	NR 163538.1
BYZ8	*Fusarium fujikuroi*	99.81	NR 111889.1

2.2 致病性测定

为确定供试真菌是否为月季的病原菌，采用离体接种法检测真菌的致病性，观察叶片的感病情况（图2）。7 d后，接种叶片上均出现了黑褐色病斑，叶片变黑腐烂，而加入无菌水的对照组（CK）未出现黑斑、腐烂的现象。表明分离的8种供试真菌均为月季致病性病原真菌。其中BYZ1隐秘刺盘孢菌的分离频率最高（21.1%），为当地月季的优势病原真菌，故选取该菌株作为靶向病原菌开展后续拮抗菌筛选实验。

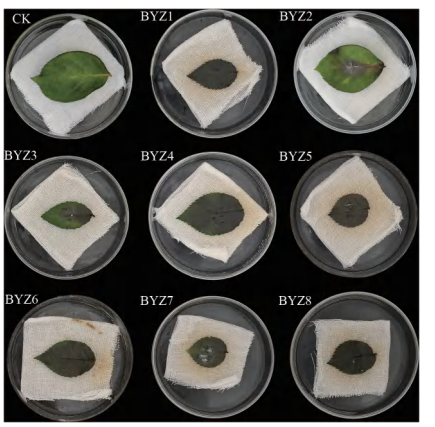
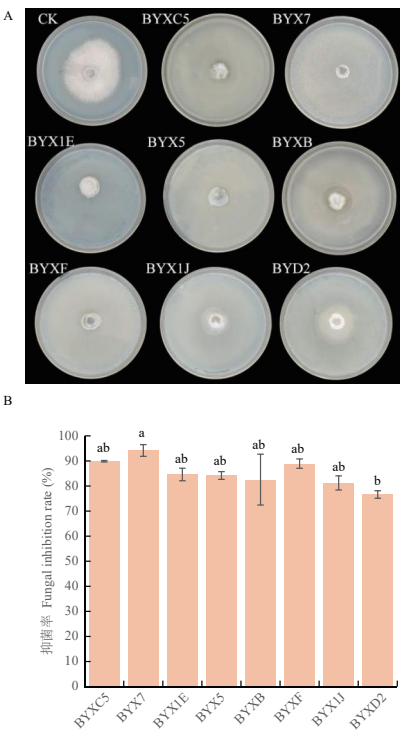


图2 8种真菌的致病性测定

Fig. 2 Pathogenicity test of the eight fungi

2.3　拮抗菌筛选

针对隐秘刺盘孢菌BYZ1，选择实验室保藏的芽胞杆菌属和假单胞菌属菌种进行拮抗菌筛选。平板对峙实验结果显示（图3），供试8株拮抗菌对隐秘刺盘孢菌均有抑制作用，其中青岛假单胞菌BYX7的抑菌效果最优，抑制率达94%，可显著抑制病原菌菌丝蔓延，使其仅局限于接种块边缘生长；日本假黄单胞菌BYXC5、托拉氏假单胞菌BYXF抑菌率次之，分别为90%、89%；其余菌株抑菌率为77%–85%，病原菌菌丝均有不同程度生长。



不同字母表示差异显著（P<0.05），下同

Different letters indicate significant differences(P<0.05). The same below

图3　8种拮抗菌对隐秘刺盘孢菌的抑菌效果（A）及抑菌率（B）

Fig. 3　Antifungal effects (A) and inhibition rates (B) of eight antagonistic bacteria against *C. aenigma*

2.4　BYX7抑菌谱

选择分离出的8种月季致病菌进行抑菌谱实验，平板对峙实验表明（图4），青岛假单胞菌BYX7对8株月季病原菌均有抑制作用，抑菌率为50%–99%，具有广谱抑菌活性。其中对布氏镰刀菌BYZ4抑制效果最显著，抑菌率达99%，病原菌仅局限于菌块生长且周围产生黄棕色色素；对BYZ1、BYZ6、BYZ7、BYZ8的抑菌率为86%–96%，病原菌菌丝可呈放射状蔓延但生长受限；对BYZ2、BYZ5的抑菌率为62%–66%，菌丝有不同程度生长且伴随色素产生；对尖孢枝孢菌BYZ3抑菌率为50%，其菌丝生长受到一定抑制。

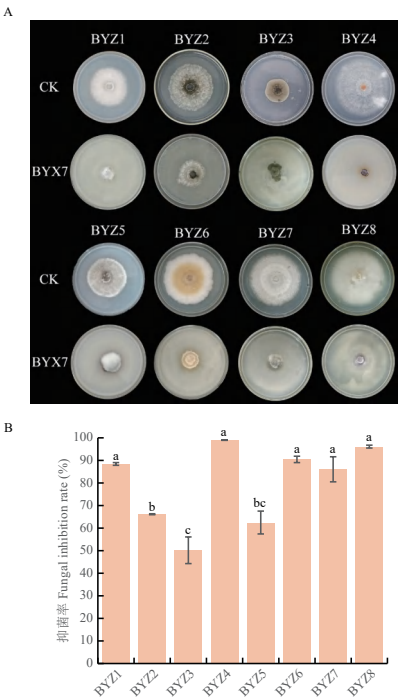


图4　青岛假单胞菌BYX7对8种病原菌的抑菌效果（A）及抑菌率（B）

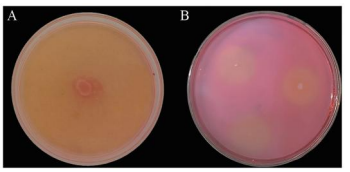
Fig. 4　Antifungal effects (A) and inhibition rates (B) of *P. qingdaonensis* BYX7 against eight pathogenic fungi

2.5　BYX7生物酶活性

青岛假单胞菌BYX7在尿素酶琼脂基础培养基上形成红色至玫瑰色光圈、在羧甲基纤维素培养基上形成透明圈（图5-A、B），表明青岛假单胞菌BYX7具有合成并分泌尿素酶和纤维素酶的能力。

2.6　BYX7促生特性

青岛假单胞菌BYX7在无机磷固体培养基上可形成透明圈（图6-A），在CAS双层培养基上出现黄色透明圈（图6-B），在Ashby无氮培养基上可正常生长（图6-C），发酵液经比色显色呈红色（图6-D），表明

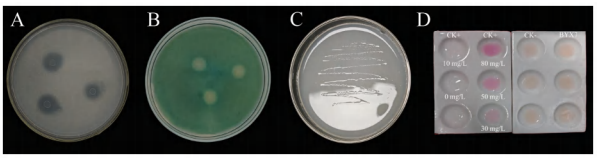


A:尿素酶活性;B:纤维素酶活性

A: Urease activity. B: Cellulase activity

图5 青岛假单胞菌BYX7生物酶活性

Fig. 5 The enzymatic activity of *P. qingdaonensis* BYX7



A:解磷实验;B:产铁载体测定;C:固氮实验;D:产IAA测定

A: Phosphorus dissolution experiment. B: Determination of siderophores. C: Nitrogen fixation experiment. D: Determination of IAA production

图6 青岛假单胞菌BYX7促生能力测定

Fig. 6 Determination of the growth-promoting ability of *P. qingdaonensis* BYX7

该菌株具有溶磷、产铁载体、固氮及产IAA的能力。

结合磷浓度、IAA浓度标准曲线（附图1）测定结果可知，青岛假单胞菌BYX7经对应培养基培养5 d后，可将1 g/L的无机磷含量降至10.1 mg/L，同时分泌IAA达12.40 mg/L，表明该菌株具备较强的溶磷能力与IAA合成能力。

2.7 高密度发酵

青岛假单胞菌BYX7的液体培养生长曲线见附图2，菌株0–8 h为迟缓期，生长缓慢；8 h后进入对数期，菌体快速增殖；20 h后进入稳定期，活菌数趋于稳定。

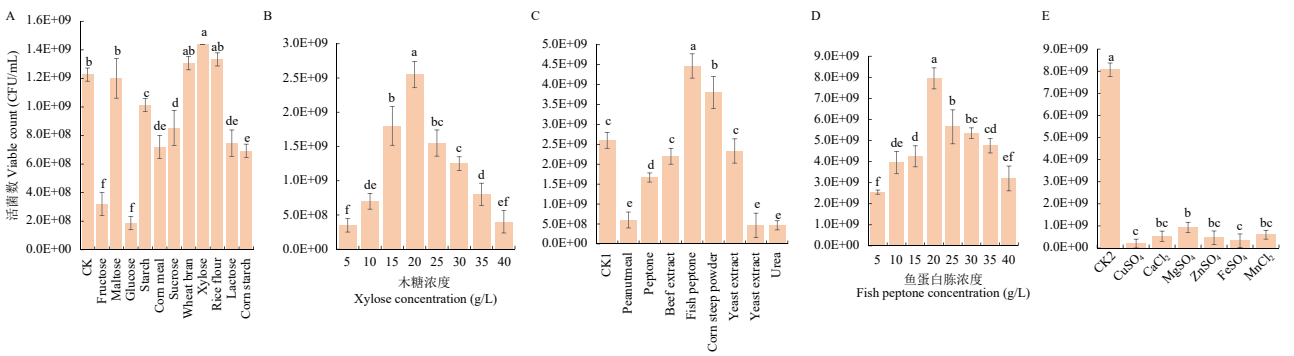
对发酵培养基碳源的筛选优化结果显示（图7-A），木糖作为碳源时菌株活菌数达1.44×10^9 CFU/mL，显著高于糖蜜等其他碳源，故选定木糖为最优碳源。木糖添加量优化结果显示（图7-B），20 g/L为最佳添加量，此时活菌数达2.55×10^9 CFU/mL，继续增加则因渗透压过高抑制菌体生长。

氮源筛选优化结果（图7-C）表明，鱼蛋白胨为最优氮源，活菌数达4.47×10^9 CFU/mL，显著高于其他氮源；其最佳添加量为20 g/L（图7-D），对应活菌数达7.95×10^9 CFU/mL。

无机盐添加试验结果（图7-E）显示，$MnCl_2$、$MgSO_4$等供试无机盐均显著降低菌株活菌数，对菌体生长存在抑制作用，故培养基中不额外添加无机盐。

发酵液pH、培养温度及摇床转速对好氧菌青岛假单胞菌BYX7的生长繁殖影响显著，单因素优化结果（图8）显示，初始pH 7.5时菌株活菌数最高，达1.19×10^{10} CFU/mL，pH过高会显著抑制菌体生长；摇床转速180 r/min时活菌数达1.65×10^{10} CFU/mL，显著优于其他转速；培养温度33 ℃时活菌数峰值达2.65×10^{10} CFU/mL，温度过高或过低均会降低菌体增殖效率。

采用Design Expert软件对温度、转速、pH进行3因素3水平Box-Benhnken中心组合试验设计，响应面设计及结果见附表2。以活菌数为响应值构建多元



A:碳源种类;B:碳源添加量;C:氮源种类;D:氮源添加量;E:无机盐种类

A: Types of carbon sources. B: Addition amount of carbon source. C: Type of nitrogen source. D: Nitrogen source addition amount. E: Types of inorganic salts

图7 发酵培养基成分优化

Fig. 7 Optimization of fermentation medium composition

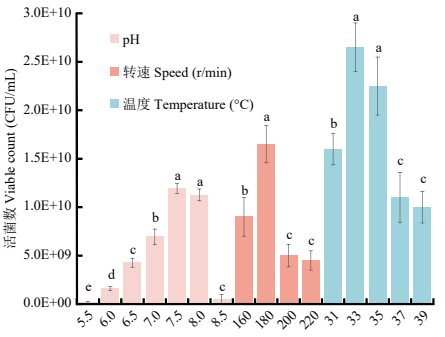


图8　发酵条件的优化

Fig. 8　Optimization of fermentation conditions

二次多项回归模型，经响应面分析结合方差检验（附表3），模型F=26.16、P<0.001，失拟项P=0.882 9，R^2=0.971 1、校正R^2=0.934 0，拟合度高且极显著，可有效预测发酵条件对BYX7活菌数的影响；各因素影响程度为转速>温度>pH，3因素2次项影响均极显著（P<0.01）。结合模型绘制温度、转速、pH的响应面曲线与等高线（图9），求极值得最优发酵条件：温度33 ℃、转速179 r/min、pH 7.5，预测活菌数2.66×10^{10} CFU/mL。经3次重复试验验证，该条件下BYX7活菌数实测均值达2.71×10^{10} CFU/mL，与预测值拟合度良好，证实模型可准确反映发酵条件对菌株活菌数的影响。

2.8　微生物菌剂的制备

吸附载体与保护剂的筛选是提升菌粉菌体存活率、制备高活性菌剂的关键。不同吸附载体对菌体存活率的影响见图10-A，麸皮、木屑、玉米芯粉作载体时存活率仅17.54%−21.35%，活性炭、硅藻土存活率显著提升至41.11%−44.44%，沸石粉为载体时存活率最高达53.33%，确定其为最佳吸附载体。

不同保护剂的筛选结果显示（图10-B），甘露醇、环糊精等保护剂对应的菌体存活率为38.73%−46.67%，海藻糖、葡聚糖可显著提高存活率，分别达66.46%、63.89%，选定海藻糖为最佳保护剂。以沸石粉为吸附载体、海藻糖为保护剂制备的微生物菌粉，活菌数达1.60×10^{8} CFU/g。

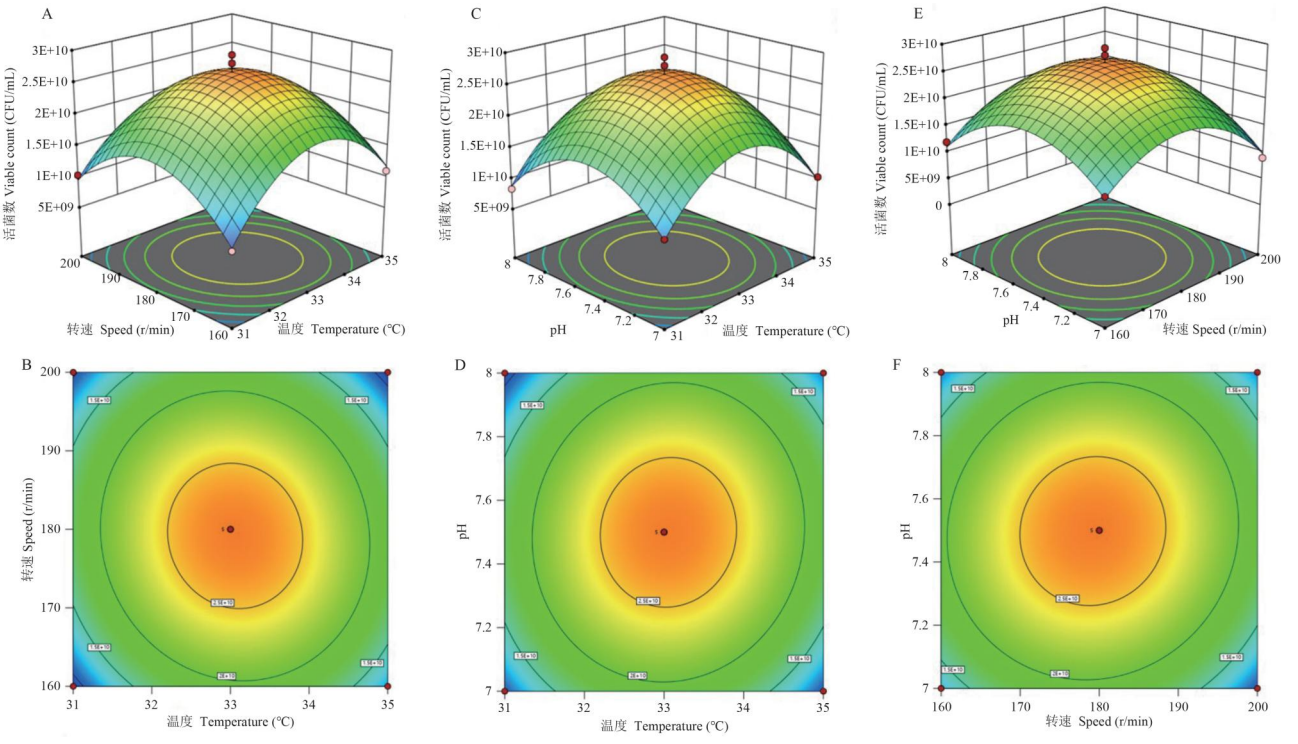
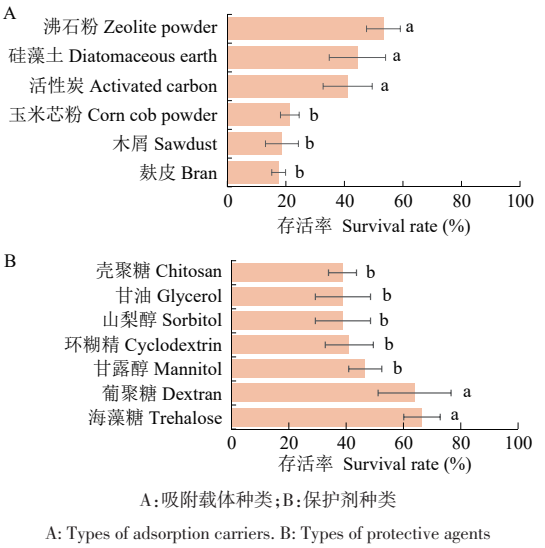


图9　发酵条件影响青岛假单胞菌BYX7活菌数的响应曲面(A、C、E)和等高线(B、D、F)

Fig. 9　Response surface (A, C, E) and contour plots (B, D, F) illustrating the effect of fermentation conditions on the viable cell count of *P. qingdaonensis* BYX7



A：吸附载体种类；B：保护剂种类

A: Types of adsorption carriers. B: Types of protective agents

图10 菌粉吸附载体和保护剂种类的优化

Fig. 10 Optimization of the types of adsorption carriers and protective agents for bacterial powder

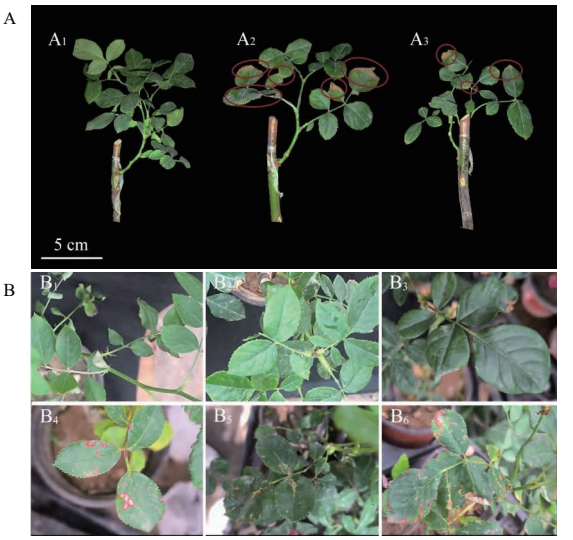
2.9 盆栽防效

青岛假单胞菌BYX7的回接试验结果显示（图11-A），月季植株的茎秆及叶片均未出现明显病斑，表明青岛假单胞菌BYX7对月季无致病性。

通过观察与统计月季发病情况及菌剂防控病害的盆栽试验结果（图11、表5），发现隐秘刺盘孢菌（*C. aenigma*）对月季叶片有很强的感染能力，植株叶片发病情况严重，大部分月季叶片表面出现红褐色斑点，病斑多呈椭圆形，病斑中央呈黄白色、边缘模糊且呈放射状扩展，伴随叶片黄化、脱落，符合月季褐斑病的典型发病症状。在对照组的盆栽处理中，发病率最低为47.37%，最高可达86.36%，病情指数达90.50%。在实验组中，月季经过所制备的菌剂处理后，植株叶片发病情况得到改善，部分月季叶片表面出现红褐色斑点，发病率最低为6.67%，最高为53.85%，病情指数达55.56%，防治指数为38.61%。

3 讨论

植物病害是制约农作物生产的关键因素之一，全球范围内每年约30%的木本植物及粮食作物因病害侵染遭受损失[23]。月季作为重要的园艺经济作物，规模化栽培中真菌病害频发，严重影响其观赏价值与产业发展。本研究从南阳月季种植基地发病植株的叶片及茎段中，分离鉴定出8种致病性真菌，



A_1：回接试验；A_2：对照组；A_3：实验组；B_1–B_3：健康叶片；B_4–B_6：病害叶片

A1: Re-inoculation group. A_2: Control group. A_3: Experimental group. B_1–B_3: Healthy leaves. B_4–B_6: Diseased leaves

图11 BYX7对月季盆栽苗的回接试验（A）及对褐斑病的防治效果（B）

Fig. 11 The re-inoculation experiment of BYX7 on rose potted seedlings (A) and its efficacy in preventing brown spot disease (B)

表5 盆栽实验发病率、病情指数及防治指数

Table 5 Incidence rate, disease index, and prevention and control index of the pot experiment

组别 Group	发病率 Incidence rate（%）	病情指数 Disease index（%）	防治指数 Prevention and control index（%）
对照组 Control group	72.29±17.28a	90.50±10.14a	—
实验组 Experimental group	32.40±22.08b	55.56±15.72a	38.61

其中隐秘刺盘孢菌分离频率最高，为当地月季的优势病原真菌，这一结果明确了南阳产区月季病害的核心致病类群，为后续精准防控提供了针对性理论依据，弥补了该区域月季优势病原菌不明确的研究空白。以该优势菌株为靶向，从8株拮抗菌中筛选出青岛假单胞菌BYX7，其对8种病原菌表现出广谱抑菌活性，且兼具产尿素酶、纤维素酶、IAA、铁载体合成、溶磷及固氮等多重促生特性，功能综合性与同类研究中的贝莱斯芽胞杆菌（*B. velezensis*）

TC-52[24]、变栖克雷伯氏菌（*Klebsiella variicola*）Kv13-2[25]等PGPR菌株类似，完全契合PGPR核心功能机制[26]，凸显了其作为优良生防菌株的应用潜力。

与现有月季病害生防研究多聚焦荧光假单胞菌、贝莱斯芽胞杆菌等常见菌株[8, 23]不同，青岛假单胞菌此前研究多集中于植物促生、土壤污染修复及非生物胁迫缓解[9–11]，其在植物病原真菌拮抗及月季病害防控中的应用鲜有报道，本研究拓展了该菌种的应用领域。在抑菌谱方面，BYX7对布氏镰刀菌、藤仓镰刀菌等抑菌率超90%，这些病原菌同时危害玉米、小麦、柑橘等作物[27–32]，提示BYX7在跨作物病害防控中具有独特优势。对假单胞菌属在内的微生物绿色防控技术及相关机制的研究发现，其抑菌效果主要与合成抑菌物质有关[9, 33–36]，而本研究发现BYX7能够抑制病原真菌，其原因可能是通过合成高亲和力铁载体导致病原菌“铁饥饿”、代谢产氨改变微环境pH值、合成胞外多糖形成生物膜抢占生态位等间接途径发挥作用[9–11]。但BYX7对尖孢枝孢菌抑菌率仅50.18%，低于其他病原菌，推测与枝孢属真菌细胞壁黑色素形成的物理屏障及孢子快速扩散的生态竞争优势相关，这一现象为后续通过代谢组学与转录组学技术解析BYX7抑菌物质的化学本质及合成调控机制、针对性改良菌株为提升低敏感性病原菌拮抗活性提供了明确方向。

通过单因素试验与响应面法优化，本研究确定了BYX7的高密度发酵最优条件，菌体浓度达2.71×10^{10} CFU/mL（较优化前提高22倍），以沸石粉为载体、海藻糖为保护剂制备的菌剂活菌数1.60×10^{8} CFU/g，为产业化生产奠定了坚实的技术基础。以隐秘刺盘孢菌（*C. aenigma*）对‘粉扇’月季进行盆栽接种实验，成功诱发月季褐斑病[37–38]，施用菌剂进行盆栽实验，结果显示该菌剂对月季褐斑病的防治指数为38.61%，低于离体抑菌活性，虽实验组病情指数（55.56%）低于对照组（90.50%），但差异未达显著水平（$P>0.05$）。深究原因，一方面月季褐斑病为气传病害，根际浇灌法导致菌株难以在叶片定殖，无法有效阻止气传侵染；另一方面，菌株在植株体表的定殖能力较弱，受盆栽微环境（湿度、光照）及土壤土著微生物竞争影响，生防作用受限，这提示后续需开发叶面喷施型制剂，结合助剂提高菌株在叶片表面的定殖能力，增强对气传病害的防控效果。同时，未来还需开展田间试验，验证菌剂在自然环境中的防效稳定性，探究其与其他生防菌或低毒杀菌剂的协同作用，构建多元化绿色防控体系，并拓展BYX7对其他园艺作物病害的防控研究，进一步挖掘其跨作物应用价值。

4　结论

从发病月季叶片及茎段中分离鉴定出8种病原真菌，筛选出抑菌效果最佳的青岛假单胞菌BYX7。该菌株兼具产尿素酶、纤维素酶、铁载体、IAA及溶磷、固氮特性。对其进行发酵条件优化后菌体浓度可达2.71×10^{10} CFU/mL，较优化前提高22倍。将其以沸石粉为载体、海藻糖为保护剂制备成微生物菌剂，其活菌数达1.60×10^{8} CFU/g，对月季褐斑病表现出良好的防治效果。

文章所有附图附表请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260608145523_NewsFile_97.pdf）。

参考文献

[1] 贾静怡, 孙倩, 张玮, 等. 北京市月季丽赤壳褐斑病病原菌鉴定 [J]. 植物病理学报, 2021, 51(3): 446-450.
Jia JY, Sun Q, Zhang W, et al. Identification of pathogen causing *Calonectria* leaf spot on *Rosa chinensis* in Beijing [J]. Acta Phytopathol Sin, 2021, 51(3): 446-450.

[2] 李艳杰. 月季黑斑病病原菌分离鉴定及防治初步研究 [D]. 昆明: 西南林业大学, 2024.
Li YJ. Preliminary study on isolation, identification and prevention and control of black spot disease of *Rosa chinensis* jacq [D]. Kunming: Southwest Forestry University, 2024.

[3] 杨珊. 绿针假单胞菌 zm-1 生物防治花生白绢病的作用机理研究 [D]. 开封: 河南大学, 2022.
Yang S. Mechanisms of biological control agaist peanut stem rot by *Pseudomonas chlororaphis* zm-1 [D]. Kaifeng: Henan University, 2022.

[4] Guzmán-Guzmán P, Santoyo G. Action mechanisms, biodiversity, and omics approaches in biocontrol and plant growth-promoting *Pseudomonas*: an updated review [J]. Biocontrol Sci Technol, 2022, 32(5): 527-550.

[5] Purtschert-Montenegro G, Cárcamo-Oyarce G, Pinto-Carbó M, et al. *Pseudomonas putida* mediates bacterial killing, biofilm

invasion and biocontrol with a type IVB secretion system [J]. Nat Microbiol, 2022, 7(10): 1547-1557.

[6] 田洁, 唐有林, 王启璋, 等. 植物根际促生菌*Pseudomonas putida* UW4对菊花扦插苗生长及生理特性的影响 [J]. 植物生理学报, 2023, 59(1): 179-190.
Tian J, Tang YL, Wang QZ, et al. Effects of plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas putida* UW4 on the growth and physiological characteristics of *Chrysanthemum* cuttings [J]. Plant Physiol J, 2023, 59(1): 179-190.

[7] 赵子璇, 李俊辉, 杜公福, 等. 防御假单胞ZF509的分离鉴定及其对甜瓜细菌性果斑病的防治效果研究 [J]. 中国生物防治学报, 2024, 40(3): 690-700.
Zhao ZX, Li JH, Du GF, et al. Isolation and identification of *Pseudomonas* ZF509 and its control effect on bacterial fruit blotch of melon [J]. Chin J Biol Control, 2024, 40(3): 690-700.

[8] 李潇潇, 师桂英, 张立彭, 等. 荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)在植物病害生物防治中的研究及展望 [J]. 草原与草坪, 2021, 41(5): 148-156.
Li XX, Shi GY, Zhang LP, et al. Application of *Pseudomonas fluorescens* in biological control of plant disease and its prospects [J]. Grassland Turf, 2021, 41(5): 148-156.

[9] 王传琪. 一株托拉氏假单胞菌*Pseudomonas tolaasii* DL001的物种鉴定及其抑菌活性物质研究 [D]. 大理: 大理大学, 2019.
Wang CQ. Study on the identification and antibacterial components from *Pseudomonas tolaasii* DL001 [D]. Dali: Dali University, 2019.

[10] Chlebek D, Płociniczak T, Gobetti S, et al. Analysis of the genome of the heavy metal resistant and hydrocarbon-degrading rhizospheric *Pseudomonas qingdaonensis* ZCR6 strain and assessment of its plant-growth-promoting traits [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(1): 214.

[11] Zainurin N, Imran M, Shaffique S, et al. New insights into the synergistic interaction between *Pseudomonas qingdaonensis* NZ 1 and silicon to mitigate drought stress in rice [J]. Microorganisms, 2025, 13(5): 1046.

[12] 张晓勇, 李树江, 龙巧芳, 等. 新几内亚凤仙花根腐病病原菌鉴定及杀菌剂室内毒力测定 [J]. 园艺学报, 2023, 50(5): 1130-1140.
Zhang XY, Li SJ, Long QF, et al. Identification of *Phytopythium helicoides* causing root rot of *Impatiens hawkeri* and toxicity test of different fungicides in laboratory [J]. Acta Hortic Sin, 2023, 50(5): 1130-1140.

[13] 杨瑾, 高佳欣, 李珍华, 等. 月季黑斑病病原菌的分离及生防菌的筛选 [J]. 运城学院学报, 2025, 43(3): 35-40.
Yang J, Gao JX, Li ZH, et al. Isolation of pathogenic bacteria and screening of biocontrol bacteria against rose black spot disease [J]. J Yuncheng Univ, 2025, 43(3): 35-40.

[14] 黄丽, 陈振民, 闫训博, 等. 一株假蕈状芽胞杆菌及在制备植物病原菌抑菌剂中的应用: CN114703094A [P]. 2022-07-05.
Huang L, Chen ZM, Yan XB, et al. A strain of *Bacillus pseudomycoides* and its application in the preparation of an antimicrobial agent against plant pathogens: CN114703094A [P]. 2022-07-05.

[15] 张嘉馨. 产氨基糖苷类次级代谢产物链霉菌的筛选及其化合物挖掘 [D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2023.
Zhang JX. Screening of *Streptomyces* producing aminoglycoside secondary metabolites and their compound mining [D]. Ala'er: Tarim University, 2023.

[16] 贾金姗, 马悦, 张俊杰, 等. 双叉犀金龟肠道纤维素降解菌的筛选及酶活力比较 [J]. 环境昆虫学报, 2025, 47(2): 361-371.
Jia JS, Ma Y, Zhang JJ, et al. Screening of intestinal cellulose-degrading bacteria and comparison of enzyme activity in the *Allomyrina* dichotoma [J]. J Environ Entomol, 2025, 47(2): 361-371.

[17] 王瑞琪, 赵为民, 魏丽萍, 等. 西藏林芝油菜根际拮抗细菌筛选及其促生特性研究 [J]. 中国植保导刊, 2021, 41(10): 16-23, 37.
Wang RQ, Zhao WM, Wei LP, et al. Screening and growth-promoting characterization of antagonistic bacteria in the rhizosphere of oilseed rape on the plateau in Linzhi [J]. China Plant Prot, 2021, 41(10): 16-23, 37.

[18] Lucero CT, Lorda GS, Anzuay MS, et al. Peanut endophytic phosphate solubilizing bacteria increase growth and P content of soybean and maize plants [J]. Curr Microbiol, 2021, 78(5): 1961-1972.

[19] 聂丽妍. 巨柏根际溶磷菌的筛选与促生特性研究 [D]. 林芝: 西藏农牧学院, 2023.
Nie LY. Screening and growth-promoting characteristics of phosphorus solubilizing strains in the of rhizosphere of cypress gigantica [D]. Linzhi: Tibet Agricultural and Animal Husbandry Universi, 2023.

[20] 蒋鑫. 玉米PGPR筛选、鉴定及其促生作用研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2024.
Jiang X. Screening, identification and growth promoting effect of PGPR in maize [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2024.

[21] 郑运祥, 刘洋, 郭文霞. 5种复配杀菌剂防治海棠锈病的田间药效试验 [J]. 北方果树, 2024(2): 21-23.
Zheng YX, Liu Y, Guo WX. Field efficacy trials of 5 compound fungicides against *Malus spectabilis* rust disease [J]. North Fruits, 2024(2): 21-23.

[22] 秦维彩, 闫晓静, 檀根甲, 等. 烯酰吗啉与嘧菌酯对辣椒疫霉病菌生物活性的比较 [J]. 植物保护学报, 2010, 37(1): 42-48.
Qin WC, Yan XJ, Tan GJ, et al. Comparative study on the efficacies of dimethomorph and azoxystrobin against *Phytophthora capsici* [J]. J Plant Prot, 2010, 37(1): 42-48.

[23] 马小方, 雷纤慧, 向义元, 等. 首次报道藤仓镰刀菌危害柑橘 [J]. 植物病理学报, 2024, 54(5): 1045-1049.

Ma XF, Lei XH, Xiang YY, et al. First report of *Fusarium fujikuroi* causing citrus diseases in China [J]. Acta Phytopathol Sin, 2024, 54(5): 1045-1049.

[24] 李坤, 洪秀杰, 王欣悦, 等. 贝莱斯芽孢杆菌TC-52的分离鉴定及其对水稻幼苗生长和立枯病的影响 [J]. 江苏农业科学, 2024, 52(10): 129-137.
Li K, Hong XJ, Wang XY, et al. Isolation and identification of *Bacillus velezensis* TC-52 and its effect on rice seedling growth and blight [J]. Jiangsu Agric Sci, 2024, 52(10): 129-137.

[25] 王飞, 杨瑾, 李雪梦, 等. 2株丹参根内促生细菌的分离鉴定及促生作用评价 [J]. 河南农业科学, 2025, 54(10): 71-80.
Wang F, Yang J, Li XM, et al. Isolation, identification and effect evaluation of two growth-promoting endophytic bacteria in *Salvia miltiorrhiza* roots [J]. J Henan Agric Sci, 2025, 54(10): 71-80.

[26] 戴梅, 宫象辉, 丛蕾, 等. PGPR制剂研发现状与发展趋势 [J]. 山东科学, 2006, 19(6): 45-48.
Dai M, Gong XH, Cong L, et al. Recent advances and research trend of PGPR agents [J]. Shandong Sci, 2006, 19(6): 45-48.

[27] Wang Y, Pruitt RN, Nürnberger T, et al. Evasion of plant immunity by microbial pathogens [J]. Nat Rev Microbiol, 2022, 20(8): 449-464.

[28] Obradović A, Stepanović J, Krnjaja V, et al. First report of maize ear rot caused by *Fusarium boothii* in Serbia [J]. Plant Dis, 2025, 109(3): 716.

[29] Wegulo SN, Valverde-Bogantes E, Bolanos-Carriel C, et al. First report of *Fusarium boothii* causing head blight of wheat in the United States [J]. Plant Dis, 2018, 102(12): 2646.

[30] Wang WY, Zhang JH, Chen BZ, et al. Occurrence of *Fusarium boothii* causing *Fusarium head* blight and crown rot of wheat in China [J]. Plant Dis, 2025, 109(7): 1590.

[31] 王杰, 王海春, 祁鹤兴, 等. 青海省民和县青贮玉米叶斑病及其病原调查初报 [J]. 植物医学, 2023, 2(1): 44-49.
Wang J, Wang HC, Qi HX, et al. Preliminary report on leaf spot and pathogens of silage maize in Minhe County of Qinghai Province [J]. Plant Health Med, 2023, 2(1): 44-49.

[32] Gao YZ, Zhang ZX, Ji M, et al. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species from herbaceous plants on grassland in Qiaojia county, China [J]. Microorganisms, 2025, 13(1): 113.

[33] 马莹, 曹梦圆, 石孝均, 等. 植物促生菌的功能及在可持续农业中的应用 [J]. 土壤学报, 2023, 60(6): 1555-1568.
Ma Y, Cao MY, Shi XJ, et al. Functions of plant growth-promoting bacteria and their application in sustainable agriculture [J]. Acta Pedol Sin, 2023, 60(6): 1555-1568.

[34] 李雪艳. 棉花内生与根际拮抗菌对黄萎病的防病机理研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2019.
Li XY. Study on the mechanism of cotton endophytic and rhizosphere antagonism against *Verticillium* wilt [D]. Urumqi: Xinjiang University, 2019.

[35] 刘梓豪. 防控玉米种栖镰刀菌的根际菌群构建与菌群内部互作机制研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2021.
Liu ZH. The construction and internal interaction mechanism of a synthetic rhizosphere microbiota in inhibiting the seed-borne *Fusarium* of maize [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2021.

[36] Lo Cantore P, Giorgio A, Iacobellis NS. Bioactivity of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas tolaasii* [J]. Front Microbiol, 2015, 6: 1082.

[37] 田永强, 张倩男, 薛致成, 等. 一株克氏假单胞菌及其应用: CN120098867B [P]. 2025-09-05.
Tian YQ, Zhang QN, Xue ZC, et al. A strain of *Pseudomonas knackmussii* and its application: CN120098867B [P]. 2025-09-05.

[38] 张雪岩, 陈雅君, 石延霞, 等. 月季褐斑病病原菌鉴定 [C]//庆祝中国园艺学会创建80周年暨第11次全国会员代表大会论文集. 广州:《园艺学报》编辑部, 2009: 198.
Zhang XY, Chen YJ, Shi YX, et al. Identification of the pathogen causing rose brown spot disease [C]//Proceedings of the 80th Anniversary of the Chinese Society for Horticultural Science and the 11th National Congress. Guangzhou: Editorial Office of Acta Horticulturae Sinica, 2009: 198.

（责任编辑　高洁）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):252-262

基于ISSR分子标记和农艺性状的大球盖菇种质资源遗传多样性分析

李诗琪[1,2] 武月园[2] 张殿朋[2] 郭远[2] 刘宇[2] 宋忠娟[2] 王守现[2*] 宋爽[2*]
（1.北京农学院植物科学技术学院,北京 102206; 2.北京市农林科学院植物保护研究所 北京市食用菌工程技术研究中心,北京 100097）

摘 要:【目的】大球盖菇（*Stropharia rugosoannulata*）栽培群体存在种质资源混杂、优异品种短缺的问题。解析不同地理来源栽培菌株的遗传多样性与表型变异特征，筛选优良种质，为大球盖菇品种改良提供科学依据。【方法】以67个不同地理来源的大球盖菇栽培菌株为材料，采用10条ISSR引物进行遗传多样性分析，同时测定10个农艺性状，结合相关性分析、主成分分析及聚类分析开展综合评价。【结果】10条ISSR引物共扩增出65条清晰条带，其中多态性条带51条，多态性位点百分率为55.56%-100%，Nei's基因多样性指数平均值为0.27，香农多样性指数平均值为0.43。UPGMA聚类分析可划分为5个类群，遗传相似系数为0.43-0.96，主成分分析累计解释28%的遗传变异，核心类群菌株分布紧密，遗传背景高度相似。农艺性状中，菌盖硬度变异系数最大（124.03%），产量香农多样性指数最高（1.88）；相关性分析显示产量与单朵重、菌盖直径等7个性状呈极显著正相关（$P<0.01$），菌丝锁状联合数量与所有农艺性状无显著相关性。主成分分析筛选出菌盖直径和菌柄直径为表型综合评价核心指标，前3个主成分累计贡献率达74.51%；综合得分排名前3的菌株为BIPP21340027、BIPP21340016和BIPP21340020，在产量和商品性状上协同优异。【结论】供试大球盖菇菌株具有遗传基础较窄、表型性状变异丰富的特征，筛选出菌盖直径、菌柄直径为表型评价核心指标，获得3份优良菌株，可为大球盖菇优异种质筛选、杂交亲本选配及新品种选育提供参考。

关键词： 大球盖菇；ISSR；农艺性状；遗传多样性；综合评价
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1351

Genetic Diversity Analysis of *Stropharia rugosoannulata* Germplasm Resources Based on ISSR Markers and Agronomic Traits

LI Shi-qi[1,2] WU Yue-yuan[2] ZHANG Dian-peng[2] GUO Yuan[2] LIU Yu[2] SONG Zhong-juan[2]
WANG Shou-xian[2*] SONG Shuang[2*]
（1. *College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing* 102206; 2. *Institute of Plant Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing Engineering Research Center for Edible Mushroom, Beijing* 100097）

Abstract:【Objective】Commercial cultivated populations of *Stropharia rugosoannulata* face challenges including genetic admixture and a lack of superior varieties. This study aimed to characterize the genetic diversity and phenotypic variation of cultivated strains from diverse geographic origins, screen for elite germplasm, and provide a scientific foundation for variety improvement.【Method】67 *S. rugosoannulata* strains were collected from different geographical regions. Genetic diversity was analyzed using 10 ISSR primers, and 10 agronomic traits were measured. A comprehensive evaluation was conducted by combining correlation analysis, principal component analysis, and cluster analysis.【Result】A total of 65 clear bands were amplified by ISSR markers, among which 51 were polymorphic, with the percentage of polymorphic loci per primer ranging from 55.56% to 100%. The average Nei's gene diversity index and Shannon diversity index were 0.27 and 0.43, respectively. UPGMA cluster analysis identified five clusters, with genetic similarity coefficients ranging from 0.43 to 0.96. Principal component analysis accounted for 28% of the total genetic variation, and strains within the core clusters were closely clustered and shared

收稿日期： 2025-12-11
基金项目： 北京市农林科学院创新能力建设项目（KJCX20230102），现代农业产业技术体系专项资金资助项目（CARS20）
*通信作者： 王守现 wangshouxian@baafs.net.cn，宋爽 songshuang@baafs.net.cn

highly similar genetic backgrounds. For agronomic traits, pileus hardness exhibited the highest coefficient of variation (124.03%), while yield had the highest Shannon diversity index (1.88). Yield was extremely significantly positively correlated with seven traits, including single fruiting body weight and pileus diameter (P<0.01), whereas the number of hyphal clamp connections showed no significant correlation with any agronomic trait. The first three phenotypic principal components contributed 74.51% of the total cumulative variance, and pileus diameter and stipe diameter were identified as the core indicators for phenotypic evaluation. Three strains (BIPP21340027, BIPP21340016, and BIPP21340020) ranked top in the comprehensive evaluation, featuring both high yield and excellent commercial traits.【Conclusion】This study revealed that the tested *Stropharia rugosoannulata* strains have a narrow genetic base yet rich phenotypic variation. Pileus diameter and stipe diameter were designated as the core indicators for phenotypic evaluation, and three elite strains were screened out. The results provide a reference for screening superior germplasm, selecting hybrid parents, and breeding new varieties of *Stropharia rugosoannulata*.

Keywords: *Stropharia rugosoannulata*; ISSR; agronomic traits; genetic diversity; comprehensive evaluation

大球盖菇（*Stropharia rugosoannulata*），学名皱环球盖菇[1]，商品名赤松茸，是目前国际食用菌市场上十大交易菇类之一，也是联合国粮农组织（FAO）向发展中国家重点推荐的栽培品种[2]。大球盖菇子实体营养丰富，牛磺酸含量高，富含多糖、类固醇等功能性成分[3-7]，具抗氧化等多种药理活性[8-10]。1980年我国从波兰引进该品种，并在1992年驯化栽培成功后[11]，大球盖菇在我国实现规模化推广。据中国食用菌协会统计，2023年全国大球盖菇总产量达49.4万t，较2017年的2.9万t增长了16倍，成为国内增速最快的食用菌之一。

随着大球盖菇栽培在我国快速实现产业化与规模化[12]，一系列制约产业健康发展的瓶颈问题也日益凸显。当前，大球盖菇产业面临种质资源混乱、优异栽培品种短缺等挑战[13]，因此对种质资源进行遗传多样性分析与评价，已成为挖掘优良基因、加快育种步伐的必然要求[14]。开展大球盖菇种质资源遗传多样性的研究，不仅能阐明其群体遗传结构，更能通过分子标记等技术手段，实现种质资源高效鉴定与亲缘关系厘清，为杂交亲本选配提供理论依据，从而为种质遗传改良奠定基础[15]。

当前有较多学者运用分子标记技术对大球盖菇种质资源进行遗传评价分析。Yan等[16]利用随机扩增多态性DNA（random amplified polymorphic DNA, RAPD）技术分析大球盖菇单核亲本群体的遗传距离。朱静娴等[17]将序列相关扩增多态性（sequence-related amplified polymorphism, SRAP）分子标记技术应用于大球盖菇研究，对23株国内外不同来源的大球盖菇菌株进行遗传多样性分析，当遗传相似系数为0.84时，23株菌株被划分为3个大类群。陈绪涛等[18]采用简单重复序列间扩增（inter simple sequence repeat, ISSR）标记分析了我国20个主栽大球盖菇品种的遗传多样性，将20株菌株分为6大类群，且类群间遗传差异显著。曾宇宇[19]利用ISSR分子标记对42株国内外大球盖菇菌株开展遗传多样性分析，结果表明10条引物共扩增109个位点，多态性比例达93.34%，供试菌株在遗传相似系数0.688处可分为3大群体；在此基础上构建的核心种质库保留了100%的等位基因和稀有等位基因，实现了对不同来源种质的有效区分与代表性浓缩。

目前针对大球盖菇种质资源遗传多样性分析以及结合农艺性状的综合评价研究较少。本研究以不同地理来源的67个大球盖菇栽培菌株为供试材料，采用10个ISSR引物分析菌株遗传多样性，同时测定农艺性状，明确大球盖菇种质的遗传分化特征与农艺性状变异规律，并进行综合评价，以期为大球盖菇优异种质资源筛选利用及新品种选育提供参考。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　供试菌株　供试67个大球盖菇栽培菌株见表1，现保藏于北京市农林科学院植物保护研究所食用菌种质资源库。

1.1.2　供试培养基　PDA综合培养基：200 g马铃薯，20 g葡萄糖，3 g磷酸二氢钾，1.5 g硫酸镁，5 g蛋白胨，10 mg维生素B_1，20 g琼脂，蒸馏水1 000 mL。液体种培养基：2 g黄豆粉，4 g玉米粉，4 g碳酸钙，6 g蔗糖，1 g酵母粉，0.2 g磷酸二氢钾，0.1 g硫酸镁，蒸馏水150 mL。栽培种培养料配方：70%木屑，20%棉籽壳，8%麦麸，1%石灰，1%石膏，含水量

表1 大球盖菇菌株编号及其来源

Table 1 Strain number and source of *S. rugosoannulata*

菌株编号 Strain number	来源 Origin	菌株编号 Strain number	来源 Origin	菌株编号 Strain number	来源 Origin	菌株编号 Strain number	来源 Origin
BIPP21340001	北京市海淀区	BIPP21340023	北京市密云区	BIPP21340040	北京市房山区	BIPP21340061	山东省
BIPP21340002	北京市通州区	BIPP21340024	北京市密云区	BIPP21340041	河北邢台临县	BIPP21340062	山东省
BIPP21340004	北京市房山区	BIPP21340025	北京市房山区	BIPP21340042	河北邢台临县	BIPP21340063	山东省
BIPP21340005	北京市房山区	BIPP21340026	北京市房山区	BIPP21340043	北京市房山区	BIPP21340064	山东省
BIPP21340008	北京市密云区	BIPP21340027	北京市密云区	BIPP21340044	陕西省安康市	BIPP21340065	山东省
BIPP21340010	北京市大兴区	BIPP21340028	北京市房山区	BIPP21340045	福建省	BIPP21340066	新疆维吾尔自治区
BIPP21340011	北京市大兴区	BIPP21340029	北京市顺义区	BIPP21340050	福建省	BIPP21340067	新疆维吾尔自治区
BIPP21340012	北京市房山区	BIPP21340030	北京市平谷区	BIPP21340051	山东省聊城市	BIPP21340068	新疆维吾尔自治区
BIPP21340013	北京市丰台区	BIPP21340031	北京市平谷区	BIPP21340052	北京市海淀区	BIPP21340069	山东省
BIPP21340015	北京市顺义区	BIPP21340032	北京市丰台区	BIPP21340053	四川省	BIPP21340070	北京市海淀区
BIPP21340016	北京市顺义区	BIPP21340033	北京市大兴区	BIPP21340054	四川省	BIPP21340072	北京市海淀区
BIPP21340017	北京市顺义区	BIPP21340034	北京市海淀区	BIPP21340055	山东省	BIPP21340074	福建省
BIPP21340018	北京市顺义区	BIPP21340035	北京市海淀区	BIPP21340056	山东省	BIPP21340081	云南省
BIPP21340019	北京市顺义区	BIPP21340036	北京市房山区	BIPP21340057	黑龙江省	BIPP21340082	云南省
BIPP21340020	北京市顺义区	BIPP21340037	北京市房山区	BIPP21340058	黑龙江省	BIPP21340085	山东省
BIPP21340021	北京市平谷区	BIPP21340038	北京市房山区	BIPP21340059	山东省	BIPP21340090	黑龙江省
BIPP21340022	北京市延庆区	BIPP21340039	北京市海淀区	BIPP21340060	山东省		

为65%。栽培料配方：90%林业修剪木屑，5%玉米芯，5%麸皮。木屑粉碎后自然堆积发酵4个月，再加入玉米芯和麸皮充分混匀，重新建堆发酵15 d，期间翻堆1次，含水量60%。

1.2 方法

1.2.1 ISSR-PCR扩增及遗传多样性分析 ISSR-PCR扩增：将67个保藏的大球盖菇菌株活化后，利用直径为6 mm的打孔器将菌丝块转接至90 mm直径培养皿的PDA平板中心，25 ℃培养。刮取菌丝体，基因组DNA按照植物DNA提取试剂盒（TIANGEN）操作。从备选引物中筛选出10条多态性位点明确、扩增条带清晰且稳定的ISSR引物（表2）用于后续PCR扩增试验。PCR反应体系：2 μL DNA模板、2 μL ISSR引物、21 μL ddH_2O、25 μL PCR Master MIX。PCR反应程序：95 ℃预变性5 min；95 ℃变性30 s，50 ℃退火30 s，重复35个循环，72 ℃延伸7 min。PCR扩增产物经1.5%浓度的琼脂糖凝胶电泳后，置于凝胶成像系统中观察拍照。对ISSR-PCR扩增产物的电泳图谱进行数据统计与分析，仅将条带清晰、位置稳定、特异性强的扩增条带纳入统计。同一位置出现清晰扩增条带记为1，未出现条带记为0，构建获得供试菌株的0/1数据矩阵。

表2 ISSR分子标记的引物及其序列

Table 2 Primer sequences of ISSR markers

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence（5′-3′）
ISSR1	CTCCTCCTCCTCSC
ISSR2	BDBACAACAACAACAACA
ISSR4	CACCACCACCACSC
ISSR5	VDHTCGTCGTCGTCGTCG
ISSR6	DHBCGACGACGACGACGA
ISSR12	AGAGAGAGAGAGAGAGT
ISSR13	GAGAGAGAGAGAGAGAC
ISSR15	CACACACACACACACAG
ISSR17	TGTGTGTGTGTGTGTGRC
ISSR18	VHVGTGTGTGTGTGTGTGT

遗传多样性分析：基于0/1数据矩阵，利用POPGENE32软件计算等位基因位点数、多态性位点数、多态位点百分率、有效等位基因数、Nei's基因多样性指数和香农多样性指数。采用NTSYS-PC2.10e的非加权配对算术平均法（unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA）进行聚类分析。采用

Origin 2024绘制主成分分析（principal components analysis, PCA）图。

1.2.2　农艺性状测定　菌丝生长速度和锁状联合数量测定：将67个保藏大球盖菇菌株活化，用直径为6 mm的打孔器沿菌落边缘打孔，取1个菌丝块接种到PDA培养基中央，置于25 ℃培养箱中培养，直至菌落直径生长至2 cm左右时，采用十字划线法标记菌落直径，每3 d标记一次，共标记3次，计算菌丝生长速度，每个菌株设置3个重复。使用光学显微镜观察供试菌株菌丝的锁状联合结构，每个菌株随机选取10个视野，分别计数各视野中锁状联合的数量，计算各菌株锁状联合平均数量。

子实体性状测定：将活化好的菌株切取多个米粒大小的菌块置于液体培养基内，于25 ℃ 160 r/min的恒温摇床培养10 d。将栽培种培养料装入17 cm×35 cm×0.05 cm聚丙烯袋中，每袋装干料500 g，121 ℃灭菌150 min，冷却至室温后，向菌袋中接种培养好的大球盖菇液体菌种，每袋接种量为20 mL，25 ℃恒温培养，待菌丝长满整个菌袋后，获得大球盖菇栽培种。大球盖菇各菌株于2024年12月20日在北京市房山区食用菌日光温室中播种，采用随机区组设计，每个菌株设置3个小区重复，小区面积为1.2 m×0.8 m，栽培料厚度30 cm，栽培种接种量为2 kg/m^2。2025年3月大球盖菇开始出菇，出菇期间气温保持在20–25 ℃，空气相对湿度保持在90%–95%。收集前3潮菇子实体并统计产量。每个菌株随机选取10个成熟度一致、大小均匀、无机械损伤、无病虫害的子实体，用电子天平称量单菇重，采用游标卡尺测定菌盖直径、菌盖厚度、菌柄长度及菌柄直径，采用果实硬度计测定菌盖硬度和菌柄硬度。

1.2.3　主成分分析及综合得分计算　利用SPSS 20.0进行主成分分析。对67个大球盖菇菌株的农艺性状数据进行标准化处理，基于标准化数据算出主成分中的特征向量，结合各性状在主成分中的特征向量值与标准化数据，得到各成分因子得分，以各成分特征值占累积特征值的比例作为权重系数，从而计算各菌株的综合得分（F），并按综合得分从高到低排序。

$$F=\sum(U_i\times Z_i)/U$$

F为菌株综合得分；Z_i为第i个主成分的因子得分；U_i为第i个主成分的特征值；U为所有入选主成分的特征值之和（即累积特征值）；i为成分因子序号。

1.2.4　数据分析　采用Microsoft Excel 2010计算农艺性状的平均值、标准差、变异系数和香农多样性指数（I）。

$$I=-\sum p_i lnp_i$$

式中，p_i为某农艺性状第i级别内材料份数（n）$_i$占总份数（N）的百分比，即p_i=n$_i$/N。

采用SPSS 20.0对农艺性状数据进行正态性检验和Pearson相关性分析，利用GraphPad Prism绘制相关性热图。采用SPSS 20.0基于平方欧氏距离对农艺性状进行聚类分析。

2　结果

2.1　ISSR分子标记遗传多样性分析

由表3可知，10个ISSR引物在67个菌株中共扩增出65条清晰条带，其中51条具有多态性，多态性位点百分率为55.56%–100%。各引物检测到的多态性位点数为3–8个，引物ISSR12和引物ISSR18的多态性片段最少，均为3个，引物ISSR1的多态性片段数最多，为8个。10个ISSR引物的Nei's基因多样性指数为0.12–0.45，平均值为0.27，香农多样性指数为0.19–0.67，平均值为0.43。

基于67个大球盖菇菌株的ISSR分子标记构建系统发育树，由图1可知，菌株间的遗传相似系数为0.43–0.96，在遗传相似系数0.686水平上（图1虚线处，系统发育树自然分支节点），可将菌株分为5大类：第I类含1个菌株BIPP21340001，第II类含1个菌株BIPP21340002，第III类含63个菌株（占比94.03%），第IV类含1个菌株BIPP21340082，第V类含1个菌株BIPP21340081。利用ISSR分子标记数据对供试大球盖菇菌株进行主成分分析，主成分1（PC1）的贡献率为18.8%，主成分2（PC2）贡献率为9.2%，二者累计解释28%的遗传变异（图2）。其中第III类的菌株紧密聚集，构成核心类群；而I、II、IV、V类的菌株与核心类群遗传差异显著，被单独区分。这与系统发育树的分类情况一致，进一步说明大球盖菇多数栽培种质遗传背景高度相似，但也存在少量明显遗传变异的菌株。

2.2　农艺性状遗传多样性分析

由表4可知，67个大球盖菇菌株的10个农艺性状的变异系数为24.20%–124.03%；其中菌柄长度的

表3 基于10个ISSR引物扩增的67个大球盖菇菌株的遗传多态性

Table 3 Genetic polymorphism of 67 *S. rugosoannulata* strains based on amplification with 10 ISSR primers

引物 Primer	扩增出的条带数 Number of amplified bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands	多态位点百分率 Percentage of polymorphic loci	观测等位基因数 Observed number of alleles	有效等位基因数 Effective number of alleles	Nei's基因多样性指数 Nei's gene diversity index	香农多样性指数 Shannon diversity index(*I*)
ISSR1	9	8	88.89%	1.89	1.59	0.34	0.67
ISSR2	7	6	85.71%	1.86	1.51	0.31	0.47
ISSR4	6	4	66.67%	1.67	1.29	0.18	0.29
ISSR5	7	5	71.43%	1.71	1.43	0.27	0.40
ISSR6	9	5	55.56%	1.56	1.22	0.15	0.23
ISSR12	5	3	60.00%	1.60	1.33	0.21	0.32
ISSR13	7	7	100%	2.00	1.83	0.45	0.64
ISSR15	4	4	100%	2.00	1.59	0.34	0.51
ISSR17	6	6	100%	2.00	1.59	0.36	0.55
ISSR18	5	3	60.00%	1.60	1.16	0.12	0.19

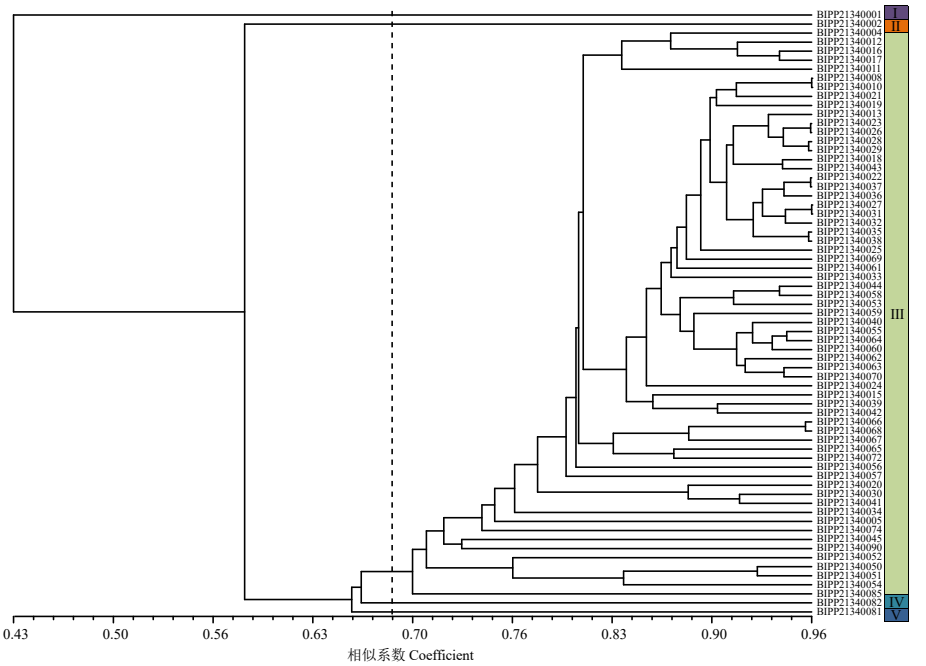


图1 基于ISSR分子标记对67个大球盖菇菌株进行UPGMA聚类分析

Fig. 1 UPGMA cluster analysis of 67 *S. rugosoannulata* strains based on ISSR markers

变异系数最小，为24.20%；菌盖硬度变异系数最大，为124.03%。香农多样性指数为1.04–1.88，其中产量的香农多样性指数最大，为1.88；菌盖厚度的香农多样性指数最小，为1.04。

图3为大球盖菇10个农艺性状的相关性热图，图中橙色梯度代表正相关，红色梯度代表负相关，颜色深浅对应相关系数绝对值大小。产量与单朵重、菌盖直径等7个性状呈极显著正相关（P<0.01），单朵重与菌盖直径、菌盖厚度等6个性状呈极显著正相关（P<0.01），菌盖直径与菌盖厚度、菌柄长度等5个性状呈极显著正相关（P<0.01），菌盖厚度与菌柄长度、菌柄直径呈极显著正相关（P<0.01），菌柄长度与菌柄直径呈极显著正相关（P<0.01），菌柄直径与菌盖硬度、菌柄硬度呈显著正相关（P<0.05），

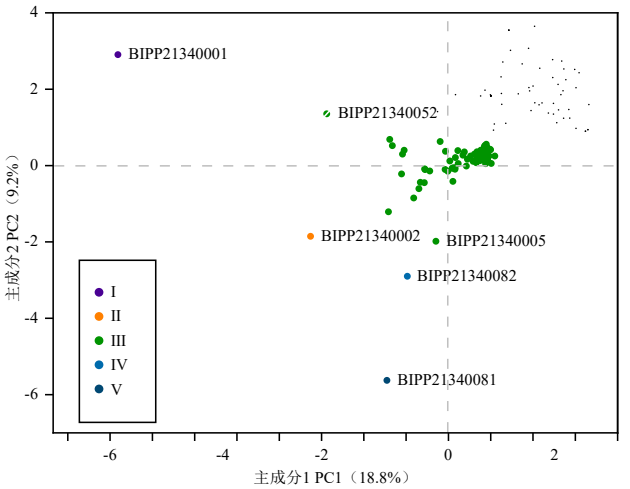
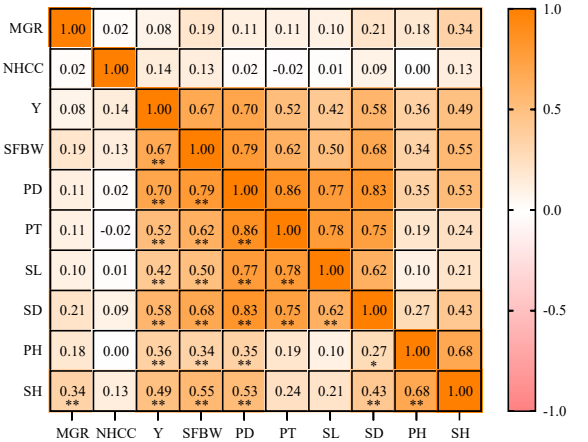


图2　基于ISSR分子标记绘制的大球盖菇菌株的主成分分析图

Fig. 2　Principal component analysis diagram of *S. rugosoannulata* strains based on ISSR markers



MGR：菌丝生长速度；NHCC：菌丝锁状联合数量；Y：产量；SFBW：单朵重；PD：菌盖直径；PT：菌盖厚度；SL：菌柄长度；SD：菌柄直径；PH：菌盖硬度；SH：菌柄硬度
MGR: Mycelial growth rate; NHCC: number of hyphal clamp connection; Y: yield; SFBW: single fruiting body weight; PD: pileus diameter; PT: pileus thickness; SL: stipe length; SD: stipe diameter; PH: pileus hardness; SH: stipe hardness. *: $P<0.05$, **: $P<0.01$

图3　大球盖菇菌株各农艺性状的相关性

Fig. 3　Correlation of agronomic traits of *S. rugosoannulata* strains

菌盖硬度与菌柄硬度呈极显著正相关（$P<0.01$）。菌丝生长速度与除菌柄硬度外的其他农艺性状的相关性较弱，菌丝锁状联合数量与所有农艺性状均无显著相关性（$|r|\leqslant 0.14$、$P>0.05$）。

由图4可知，当平方欧式距离为10时，可根据农艺性状将67个菌株划分为3个类群，类群I包含56个菌株，类群II包含其余10个菌株，类群III包含剩下1个菌株。而类群I又可细分为两个亚类，亚类1包含18个菌株，亚类2包含剩余38个菌株。BIPP21340043单独聚为一支，表明在农艺性状上与其他菌株有明显差异。

2.3　综合评价

根据10个农艺性状的主成分分析结果表明（表5），前3个主成分累计贡献率74.51%。主成分1贡献率为49.00%，其中特征向量较大的性状为菌盖

表4　大球盖菇菌株农艺性状的统计描述和遗传多样性指数

Table 4　Statistical description of agronomic traits and genetic diversity parameters of *S. rugosoannulata* strains

农艺性状 Agronomic traits	平均值±标准差 Mean±SD（n=67）	最大值 Maximum	最小值 Minimum	变异系数 Coefficient of variation（CV）（%）	香农多样性指数 Shannon diversity index（I）
菌丝生长速度 Mycelial growth rate（mm/d）	3.83±1.36	8.51	1.16	35.51	1.67
菌丝锁状联合数量 Number of hyphal clamp connection	19.40±11.13	56.00	0.00	57.37	1.45
产量 Yield（g）	1 463.54±1 038.29	4 430.48	17.76	70.94	1.88
单朵重 Single fruiting body weight（g）	29.92±10.01	60.04	8.22	33.46	1.06
菌盖直径 Pileus diameter（mm）	34.57±10.40	48.63	9.97	30.08	1.33
菌盖厚度 Pileus thickness（mm）	10.55±3.23	17.87	2.80	30.62	1.04
菌柄长度 Stipe length（mm）	53.63±12.98	71.86	21.39	24.20	1.51
菌柄直径 Stipe diameter（mm）	25.04±8.45	51.07	2.20	33.75	1.21
菌盖硬度 Pileus hardness（HB）	1.29±1.60	11.88	0.28	124.03	1.13
菌柄硬度 Stipe hardness（HB）	1.39±0.89	4.48	0.26	64.03	1.22

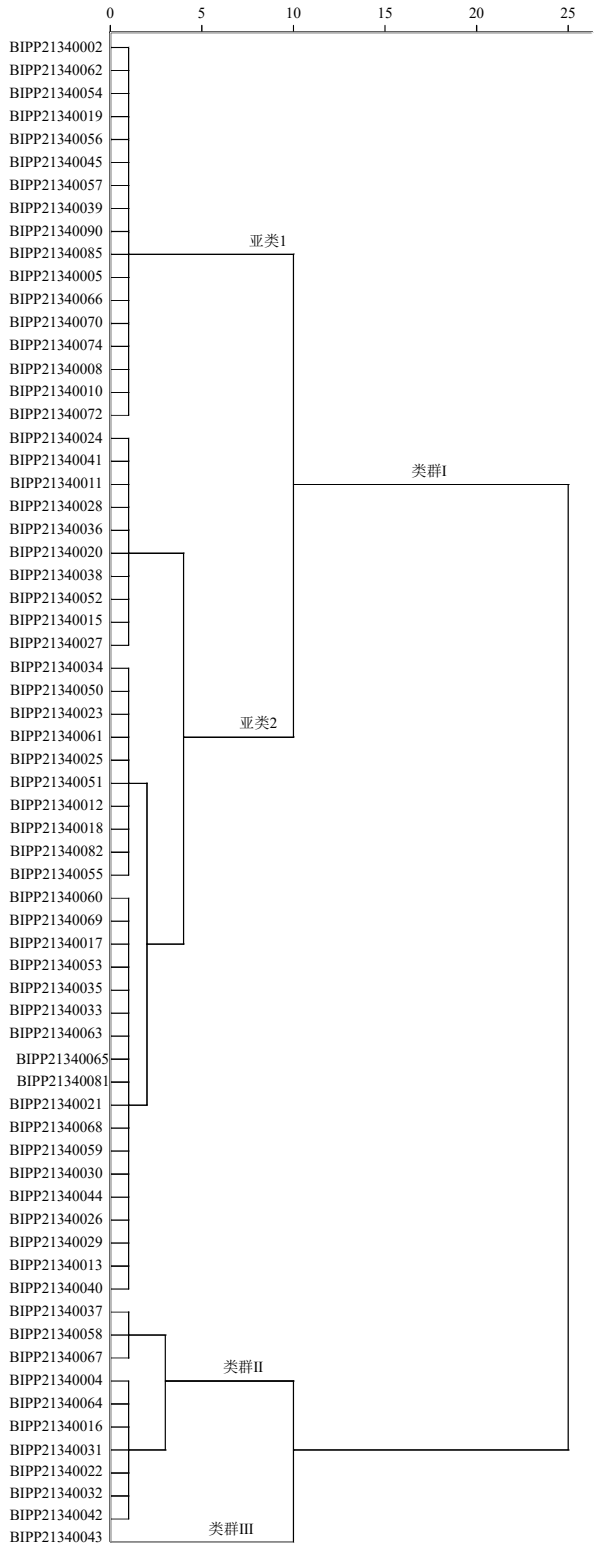


图4 基于大球盖菇菌株农艺性状的Q型聚类分析

Fig. 4 Q-cluster analysis based on agronomic traits of *S. rugosoannulata* strains

直径、菌柄直径和单朵重；主成分2贡献率为15.23%，该成分中菌柄硬度和菌盖硬度的特征向量绝对值较大；主成分3贡献率为10.28%，菌丝锁状联合数量和菌丝生长速度的特征向量绝对值较高。将各性状在3个主成分中特征向量绝对值的总和排序，菌盖直径与菌柄直径位居前列，且在各主成分中的贡献值较大，表明这两个农艺性状是大球盖菇表型综合评价的关键性状。综合得分采用主成分方差贡献率加权计算：F=0.658×PC1+0.204×PC2+0.138×PC3，结果显示F介于-1.60–1.35（表6），BIPP21340027、BIPP21340016和BIPP21340020为得分前3的菌株，其生长情况和子实体形态见图5。

3 讨论

种质资源的遗传多样性水平及其优异性状丰富度，是支撑食用菌产业持续发展、保障高效育种工作的核心物质基础，同时也是影响育种效率的关键因素[20]。随着分子生物学技术的快速发展，分子标记技术已广泛应用于生物群体遗传多样性研究[21-22]，其中ISSR分子标记因操作简便、高效快捷的优势，在种质资源遗传多态性分析及种内菌株亲缘关系鉴别中应用广泛[23-24]。本研究通过ISSR分子标记对67份大球盖菇种质资源进行基因水平的遗传多样性分析，结果显示，供试菌株基于ISSR分子标记的遗传相似系数为0.43–0.96，表明菌株间存在一定的遗传变异。而基于ISSR标记的主成分分析进一步验证了这一结果：主成分1与主成分2累计解释28.0%的遗传变异，核心类群菌株分布紧密，遗传背景高度相似。这与Gong等[25]的研究一致，其指出尽管大球盖菇在中国栽培范围较广，但当前实际应用的栽培菌株多源于有限的原始种质资源，且该特征在香菇的相关研究中亦有报道[26]。这一群体结构特征推测与两方面因素相关：一是引种驯化过程中的人工选择偏好，形成遗传背景相似的核心类群；二是边缘菌株可能源于未经过度选育的野生资源或特异地理种群，携带独特的遗传变异位点[27-28]，可为大球盖菇遗传资源的多样性补充提供潜在材料，该群体结构特征为核心种质库的构建提供了分子水平依据。ISSR分子标记在食用菌种质资源评价中的有效性，得到了多个研究印证，宋莹等[29]采用ISSR分子标记技术对辽宁省20个主栽香

表5　大球盖菇菌株农艺性状的主成分分析

Table 5　Principal component analysis of agronomic traits of *S. rugosoannulata* strains

农艺性状 Agronomic traits	主成分 Principal component		
	1	2	3
菌丝生长速度 Mycelial growth rate on PDA medium	0.253	0.429	-0.271
菌丝锁状联合数量 Number of hyphal clamp connection	0.103	0.192	0.932
产量 Yield	0.768	0.083	0.171
单朵重 Single fruiting body weight	0.848	0.053	0.095
菌盖直径 Pileus diameter	0.959	-0.176	-0.032
菌盖厚度 Pileus thickness	0.828	-0.408	-0.085
菌柄长度 Stipe length	0.736	-0.454	-0.058
菌柄直径 Stipe diameter	0.860	-0.147	0.018
菌盖硬度 Pileus hardness	0.475	0.660	-0.186
菌柄硬度 Stipe hardness	0.636	0.657	-0.036
特征值 Eigenvalue	4.90	1.52	1.03
贡献率 Contribution rate（%）	49.00	15.23	10.28
累计贡献率 Cumulative contribution rate（%）	49.00	64.23	74.51

菇菌株进行遗传差异性分析，从30个随机引物中筛选出9个有效引物，共扩增出72条清晰条带，多态性条带占比83.3%，当遗传系数为0.36时可将供试菌株聚为4个类群，明确了菌株间的遗传分化关系。王洪秀等[30]对92株茶树菇菌株开展遗传多样性研究，发现20条引物共扩增317条带，多态性比率达82.60%，在遗传相似系数0.742时将其划分为6大类群。上述研究表明，ISSR分子标记是食用菌种质资源鉴定的有效手段。

农艺性状是种质资源表型评价的核心指标，其变异特征与相关性规律可为高产优质种质筛选提供直接参考。本研究结果从农艺性状遗传多样性特征来看，67份大球盖菇种质的10个性状变异系数为8.38%–124.03%，其中菌盖硬度变异系数最大为124.03%，显著高于现有食用菌农艺性状研究中报道的变异水平[31–32]，这可能由于大球盖菇各菌株出菇时间存在差异，该性状可能对湿度、温度、培养料营养等环境因素极为敏感，导致性状变异非常显著。产量的香农多样性指数最高，其变异系数（70.94%）仅次于菌盖硬度，这与毛头鬼伞遗传多样性指数较高的性状对应的变异系数也较大的研究规律一致[33]。本研究相关性分析表明，产量与单朵重、菌盖直径等性状呈极显著正相关，说明这些性状可作为高产种质筛选的关键指标，这与曾宇宇[19]在42份大球盖菇核心种质中发现“高产个体普遍具有大盖、重朵”的研究结论一致。值得注意的是，菌丝锁状联合数量与所有农艺性状均无显著相关性（$|r|\leq0.14$，$P>0.05$），这与部分研究中“锁状联合数量与食用菌产量正相关”的观点存在差异[34–35]。Yan等[16]对大球盖菇单核菌株的研究也发现锁状联合数量与菌丝生长速度无显著关联，而在黑木耳等物种中，锁状联合数量虽与产量相关[35]，但可能受栽培环境、菌株遗传背景的调控更显著。因此后续大球盖菇种质资源评价可聚焦于分子标记与农艺性状的关联分析，无需额外测定菌株锁状联合数量。

聚类分析结果显示，基于农艺性状的系统聚类在平方欧式距离10处将67个菌株划分为3个类群，其中类群I包含56个菌株，并分为两个亚类：亚类1的18个菌株在菌柄长度、菌盖硬度等性状上表现突出，遗传背景高度相似；亚类2的38个菌株则在单朵重、菌盖直径等性状上高度协同。类群II及类群III因产量特征区别于其他类群而聚类，菌株BIPP21340043虽产量显著高于其余菌株，但存在菌柄直径偏短、硬度偏小及生长速率较慢的特征，导致其商品性欠佳，故单独成支。对比基于ISSR分子标记的系统聚类与上述农艺性状聚类结果发现，两者整体呈现出较好的对应性：分子聚类中亲缘关系

表6 大球盖菇菌株农艺性状的综合得分和排名

Table 6 Comprehensive scores and rankings of agronomic traits of *S. rugosoannulata* strains

菌株 Strain	综合得分 Comprehensive score	排名 Ranking	菌株 Strain	综合得分 Comprehensive score	排名 Ranking
BIPP21340027	1.35	1	BIPP21340060	0.09	35
BIPP21340016	1.18	2	BIPP21340036	0.07	36
BIPP21340020	1.17	3	BIPP21340052	0.06	37
BIPP21340041	1.06	4	BIPP21340018	0.05	38
BIPP21340011	0.97	5	BIPP21340040	0.03	39
BIPP21340015	0.81	6	BIPP21340068	0.00	40
BIPP21340031	0.80	7	BIPP21340055	-0.01	41
BIPP21340032	0.79	8	BIPP21340025	-0.07	42
BIPP21340004	0.77	9	BIPP21340023	-0.12	43
BIPP21340029	0.72	10	BIPP21340033	-0.13	44
BIPP21340038	0.64	11	BIPP21340081	-0.17	45
BIPP21340013	0.61	12	BIPP21340063	-0.18	46
BIPP21340043	0.58	13	BIPP21340059	-0.26	47
BIPP21340030	0.57	14	BIPP21340061	-0.39	48
BIPP21340037	0.56	15	BIPP21340010	-0.42	49
BIPP21340028	0.55	16	BIPP21340008	-0.44	50
BIPP21340021	0.53	17	BIPP21340034	-0.52	51
BIPP21340069	0.50	18	BIPP21340050	-0.67	52
BIPP21340058	0.46	19	BIPP21340072	-0.68	53
BIPP21340051	0.41	20	BIPP21340039	-0.69	54
BIPP21340067	0.39	21	BIPP21340001	-0.85	55
BIPP21340022	0.38	22	BIPP21340070	-0.94	56
BIPP21340044	0.37	23	BIPP21340057	-0.95	57
BIPP21340035	0.36	24	BIPP21340054	-0.96	58
BIPP21340065	0.32	25	BIPP21340066	-1.04	59
BIPP21340042	0.32	26	BIPP21340019	-1.05	60
BIPP21340026	0.31	27	BIPP21340002	-1.07	61
BIPP21340053	0.27	28	BIPP21340045	-1.10	62
BIPP21340017	0.26	29	BIPP21340090	-1.16	63
BIPP21340074	0.22	30	BIPP21340005	-1.20	64
BIPP21340064	0.17	31	BIPP21340062	-1.23	65
BIPP21340012	0.17	32	BIPP21340085	-1.25	66
BIPP21340082	0.14	33	BIPP21340056	-1.60	67
BIPP21340024	0.13	34			

较近的菌株，在农艺性状上多归属于同一表型类群，仅少数菌株可能因环境影响出现偏差。主成分分析中，前3个主成分累计贡献率达74.51%，可有效浓缩原始数据信息，结合特征向量绝对值与主成分贡献率，筛选出菌盖直径和菌柄直径为表型综合评价的核心指标，这两个性状与单朵重和产量均呈显著正相关。基于主成分分析计算的综合得分显示，BIPP21340027、BIPP21340016、BIPP21340020等菌株综合得分较高，在菌盖直径、菌柄直径和产量等关键性状上表现优异，可作为优质育种材料进一步利用。本研究为大球盖菇优异种质的筛选提供了依据，也为后续新品种选育提供一定参考。

4 结论

通过ISSR分子标记与农艺性状，系统分析了67个



图5　筛选出的3个大球盖菇菌株出菇和子实体照片

Fig. 5　Fruiting and fruiting body photographs of the three selected *S. rugosoannulata* strains

大球盖菇栽培菌株的遗传多样性特征与表型变异规律。大球盖菇栽培菌株存在一定遗传分化，但核心类群菌株分布紧密，遗传背景高度相似，其农艺性状变异丰富。

参考文献

[1] 罗信昌, 陈士瑜. 中国菇业大典 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2010: 986-1003.
Luo XC, Chen SY. Collection of mushroom industry in China [M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2010: 986-1003.

[2] 张颖. 大球盖菇北方棚内反季栽培技术 [J]. 中国林副特产, 2014(6): 54-55.
Zhang Y. Off-season cultivation techniques of *Pleurotus ostreatus* in northern greenhouse [J]. For Prod Speciality China, 2014(6): 54-55.

[3] Brodzinska Z., Lasota W. Chemical composition of cultivated mushrooms Part I. Stropharia rugoso-annulata Farlow ex Murr [J]. Bromatol. I Chem. Toksykol. 1981, 14, 229-238.

[4] 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所. 食物成分表[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 52-53.
Institute of Nutrition and Food Safety, Chinese Academy of Preventive Medicine. Food Composition Table[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 52-53.

[5] 王晓炜, 詹巍, 陶明煊, 等. 大球盖菇营养成分、抗氧化活性物质分析 [J]. 食用菌, 2007, 29(6): 62-63.
Wang XW, Zhan W, Tao MX, et al. Analysis of nutritional components and antioxidant active substances of *Pleurotus ostreatus* [J]. Edible Fungi, 2007, 29(6): 62-63.

[6] Liu YT, Sun J, Luo ZY, et al. Chemical composition of five wild edible mushrooms collected from Southwest China and their antihyperglycemic and antioxidant activity [J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(5): 1238-1244.

[7] 李淑荣, 王丽, 倪淑君, 等. 大球盖菇不同部位氨基酸含量测定及营养评价 [J]. 食品研究与开发, 2017, 38(8): 95-99.
Li SR, Wang L, Ni SJ, et al. The amino acids content of different part of *Stropharia* rugoso-annulata and their nutrition evaluation [J]. Food Res Dev, 2017, 38(8): 95-99.

[8] Wei L, Jing BN, Li X, et al. Evaluation of nutritional ingredients, biologically active materials, and pharmacological activities of *Stropharia rugosoannulata* grown under the bamboo forest and in the greenhouse [J]. J Food Qual, 2021, 2021: 5478227.

[9] Wu J, Fushimi K, Tokuyama S, et al. Functional-food constituents in the fruiting bodies of *Stropharia rugosoannulata* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2011, 75(8): 1631-1634.

[10] Yan QX, Huang MX, Sun P, et al. Steroids, fatty acids and ceramide from the mushroom *Stropharia rugosoannulata* Farlow apud Murrill [J]. Biochem Syst Ecol, 2020, 88: 103963.

[11] 颜淑婉, 苏诗垂. 大球盖菇人工栽培研究简报 [J]. 江苏食用菌, 1995(3): 2.
Yan SW, Su SC. Brief report on artificial cultivation of *Pleurotus ostreatus* [J]. Jiangsu Edible Fungi, 1995(3): 2.

[12] Zhang Y, Ni JP, Yang J, et al. *Citrus* stand ages regulate the fraction alteration of soil organic carbon under a *Citrus*/Stropharua rugodo-annulata intercropping system in the Three Gorges Reservoir area, China [J]. Environ Sci Pollut Res, 2017, 24(22): 18363-18371.

[13] 任纪帆, 朱静娴, 王庆佶, 等. 大球盖菇"山农球盖3号"品种的选育 [J]. 菌物学报, 2020, 39(6): 977-982.
Ren JF, Zhu JX, Wang QJ, et al. Breeding of *Stropharia rugosoannulata* "shannongqiugai No. 3" [J]. Mycosystema, 2020, 39(6): 977-982.

[14] 宋爽, 刘宇, 武月园, 等. 野生白灵侧耳种质资源遗传多样性分析和评价 [J]. 食用菌学报, 2025, 32(3): 120-130.
Song S, Liu Y, Wu YY, et al. Genetic diversity analysis and evaluation of wild *Pleurotus tuoliensis* germplasm resources [J]. Acta Edulis Fungi, 2025, 32(3): 120-130.

[15] 陆欢, 尚晓冬, 宋春艳, 等. 基于ISSR标记和农艺性状的金顶侧耳种质资源遗传多样性分析 [J]. 食用菌学报, 2022, 29(6): 14-24.
Lu H, Shang XD, Song CY, et al. Genetic diversity analysis of *Pleurotus citrinopilestu* germplasm resources based on ISSR markers and agronomic traits [J]. Acta Edulis Fungi, 2022, 29(6): 14-24.

[16] Yan PS, Jiang JH, Li GF, et al. Mating system and DNA polymorphism of monokaryons with different mating type of *Stropharia* rugoso-annulata [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2003, 19(7): 737-740.

[17] 朱静娴, 李丽君, 赵淑芳, 等. 基于SRAP分子标记的23株大球盖菇遗传多样性和亲缘关系分析 [J]. 山东农业科学, 2018, 50(3): 22-28.
Zhu JX, Li LJ, Zhao SF, et al. Genetic diversity and phylogenetic

relationship analysis of 23 *Stropharia rugosoannulata* strains based on SRAP molecular marker [J]. Shandong Agric Sci, 2018, 50(3): 22-28.

[18] 陈绪涛, 章炉军, 孙鹏, 等. 我国主栽皱环球盖菇菌株遗传多样性及栽培特性 [J]. 菌物学报, 2021, 40(12): 3081-3095.
Chen XT, Zhang LJ, Sun P, et al. Genetic diversity and cultivation characteristics of the main cultivars of *Stropharia rugosoannulata* in China [J]. Mycosystema, 2021, 40(12): 3081-3095.

[19] 曾宇宇. 大球盖菇核心种质库构建及其基质降解能力分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
Zeng YY. Establishment of core collections and analysis of substrate degradation ability of *Stropharia rugosoannulata* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023.

[20] 鲍大鹏. 我国食用菌遗传学的发展及展望 [J]. 菌物学报, 2021, 40(4): 806-821.
Bao DP. Development and prospect of genetics of edible mushrooms in China [J]. Mycosystema, 2021, 40(4): 806-821.

[21] 仇律雯, 杨扬, 范亚明, 等. 国家东南区鲜食糯玉米品质及农艺性状与SSR标记遗传多样性分析 [J]. 江苏农业科学, 2022, 50(18): 130-135.
Qiu L, Yang Y, Fan YM, et al. Genetic diversity analysis of quality, agronomic traits and SSR markers of fresh waxy maize in Southeastern China [J]. Jiangsu Agric Sci, 2022, 50(18): 130-135.

[22] 赫卫, 张慧. 基于表型性状和SRAP标记的观赏用辣椒种质资源遗传多样性分析 [J]. 中国瓜菜, 2022, 35(1): 16-23.
He W, Zhang H. Analysis of genetic diversity of pepper germplasm resources for ornamental based on phenotypic traits and SRAP markers [J]. China Cucurbits Veg, 2022, 35(1): 16-23.

[23] 李辉玲, 张建文, 李守明. 基于SSR标记的新疆大蒜及其野生蒜种遗传多样性及聚类分析 [J]. 江苏农业科学, 2022, 50(18): 158-163.
Li HL, Zhang JW, Li SM. Genetic diversity and clustering analysis of Xinjiang garlic and wild garlic resources based on SSR markers [J]. Jiangsu Agric Sci, 2022, 50(18): 158-163.

[24] 陈兆贵, 张荃锋, 卢晓琪, 等. 基于ISSR分子标记的冬种马铃薯品种遗传多样性分析 [J]. 湖南农业科学, 2022(1): 8-11.
Chen ZG, Zhang QF, Lu XQ, et al. Genetic diversity analysis of winter potato varieties based on ISSR molecular markers [J]. Hunan Agric Sci, 2022(1): 8-11.

[25] Gong WB, Zeng YY, Li XR, et al. Molecular profiling of rice straw degradability discrepancy in *Stropharia rugosoannulata* core germplasm [J]. J Agric Food Chem, 2024, 72(45): 25379-25390.

[26] 杨瑞恒, 吴莹莹, 宋春艳, 等. 基于公共数据库信息对中国野生香菇种质资源地理分布的再分析 [J]. 菌物学报, 2018, 37(3): 335-351.
Yang RH, Wu YY, Song CY, et al. Reanalysis of geographical distribution of wild *Lentinula edodes* in China based on the information from public databases [J]. Mycosystema, 2018, 37(3): 335-351.

[27] 刘天宇. 马尾松种子园亲本GBS-SNP开发及群体遗传多样性研究 [D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2023.
Liu TY. Genetic diversity of parent in seed orchard of *Pinus massoniana* using SNP calling from genotyping by sequencing [D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology, 2023.

[28] Xiao Y, Cheng XJ, Liu J, et al. Population genomic analysis uncovers environmental stress-driven selection and adaptation of *Lentinula edodes* population in China [J]. Sci Rep, 2016, 6: 36789.

[29] 宋莹, 刘俊杰, 刘岩岩, 等. 辽宁省主栽香菇菌株ISSR遗传差异性分析 [J]. 北方园艺, 2017(5): 82-85.
Song Y, Liu JJ, Liu YY, et al. ISSR analysis of genetic diversity of main cultivated strains of *Lentinula edodes* in Liaoning [J]. North Hortic, 2017(5): 82-85.

[30] 王洪秀, 章炉军, 孙鹏, 等. 对92个茶树菇菌株的遗传多样性分析和农艺性状的评价 [J]. 微生物学杂志, 2024, 44(2): 19-32.
Wang HX, Zhang LJ, Sun P, et al. Genetic diversity and agronomic traits evaluation of 92 tea tree mushroom (*Agrocybe aegerita*) strains [J]. J Microbiol, 2024, 44(2): 19-32.

[31] 刘芹, 孔维丽, 崔筱, 等. 基于模糊数学和聚类分析的香菇品种综合品质评价 [J]. 中国瓜菜, 2021, 34(11): 37-46.
Liu Q, Kong WL, Cui X, et al. Comprehensive quality evaluation of *Lentinula edodes* using fuzzy mathematics and cluster analysis [J]. China Cucurbits Veg, 2021, 34(11): 37-46.

[32] 梁雪迪, 吴杰, 刘金玲, 等. 香菇产量及其构成因素的相关性和回归分析 [J]. 中国瓜菜, 2024, 37(10): 56-62.
Liang XD, Wu J, Liu JL, et al. Correlation and regression analysis of *Lentinula edodes* yield and its constituent factors [J]. China Cucurbits Veg, 2024, 37(10): 56-62.

[33] 曹雪莲, 陈影, 彭卫红, 等. 毛头鬼伞种质资源农艺性状遗传多样性分析及综合评价 [J]. 食用菌学报, 2022, 29(5): 53-64.
Cao XL, Chen Y, Peng WH, et al. Genetic diversity analysis and comprehensive evaluation of agronomic traits of *Coprinus comatus* germplasm resources [J]. Acta Edulis Fungi, 2022, 29(5): 53-64.

[34] 王瑞娟, 尚晓冬, 杨慧, 等. 不同保藏方法对金针菇"上研1号"栽培特性的影响 [J]. 食用菌学报, 2019, 26(1): 11-17.
Wang RJ, Shang XD, Yang H, et al. Effect of different preservation methods on the main cultivation characteristics of *Flammulina velutipes* "shangyan 1" [J]. Acta Edulis Fungi, 2019, 26(1): 11-17.

[35] 董锡文, 朱德旋, 杜春梅, 等. 4种维生素对黑木耳锁状联合菌丝形成的影响 [J]. 安徽农业科学, 2019, 47(5): 56-57, 61.
Dong XW, Zhu DX, Du CM, et al. The effects of four kinds of vitamin on the forming of hyphal clamp connection of aurieuzaria auricular [J]. J Anhui Agric Sci, 2019, 47(5): 56-57, 61.

(责任编辑 朱琳峰)

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):263-273

大蓟O-糖基转移酶*CjUGT10*功能表征及酶学特性

陈影虹[1, 2, 3] 曹先慧[1, 2, 3] 易佩琴[1, 2, 3] 詹若挺[1, 2, 3] 马东明[1, 2, 3, 4, 5*]

（1.广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心，广州 510006；2.广州中医药大学岭南中药资源教育部重点实验室，广州 510006；3.广州中医药大学中药学院，广州 510006；4.广州中医药大学东莞研究所，东莞 523808；5.广东中医药实验室，珠海 519000）

摘 要： 【目的】克隆并鉴定大蓟（*Cirsium japonicum* Fisch. ex DC.）中参与黄酮苷生物合成的关键尿苷二磷酸糖基转移酶基因*CjUGT10*（GenBank：PX578358），明确其底物特异性、糖基化位点及催化特性。【方法】基于大蓟转录组数据克隆*CjUGT10*基因；通过多序列比对与系统发育分析确定其家族分类；利用RT-qPCR检测该基因在不同组织中的表达模式；构建pMAL-*CjUGT10*原核表达载体，纯化重组蛋白后进行体外酶促反应，结合HPLC和酶动力学分析其底物宽泛性、糖基化位点及催化效率。【结果】*CjUGT10*属于*UGT73*家族，氨基酸序列含有高度保守的PSPG-box，第43位和第44位分别为E和Q。该基因在叶片中高表达。体外酶活表明，*CjUGT10*以UDP-葡萄糖为唯一糖供体，可催化柳穿鱼黄素、木犀草素和高车前素的7-OH或蓟黄素的4′-OH葡萄糖基化，生成4种关键黄酮苷。酶动力学参数显示，其对木犀草素的催化效率最高（k_{cat}/K_m=2.82 L/（μmol·s））。【结论】*CjUGT10*是一个具有底物广谱性和位点灵活性的双功能黄酮糖基转移酶，参与大蓟主要活性成分黄酮苷的生物合成。

关键词： 大蓟；糖基转移酶；黄酮苷生物合成；基因克隆；功能鉴定；酶动力学

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0180

Functional Characterization and Enzymatic Properties of the O-Glycosyltransferase *CjUGT10* from *Cirsium japonicum* Fisch. ex DC.

CHEN Ying-hong[1, 2, 3] CAO Xian-hui[1, 2, 3] YI Pei-qin[1, 2, 3] ZHAN Ruo-ting[1, 2, 3] MA Dong-ming[1, 2, 3, 4, 5*]

(1. *Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou* 510006; 2. *Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou* 510006; 3. *School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou* 510006; 4. *Dongguan Institute of Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan*, 523808; 5. *Chinese Medicine Guangdong Laboratory, Zhuhai* 519000)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to clone and functionally characterize *CjUGT10* (GenBank: PX578358), a key uridine diphosphate-dependent glycosyltransferase (UGT) involved in flavonoid glycoside biosynthesis in the traditional Chinese medicinal herb *Cirsium japonicum* Fisch. ex DC., and to elucidate its substrate specificity, regioselectivity, and catalytic properties. 【Method】 The full-length coding sequence of *CjUGT10* was isolated from *C. japonicum* based on transcriptome data. Phylogenetic and multiple sequence alignment analyses were performed to determine its family classification. Tissue-specific expression patterns were analyzed by RT-qPCR. The recombinant CjUGT10 protein was expressed in *Escherichia coli* using the pMAL system, purified by amylose affinity chromatography, and subjected to *in vitro* enzymatic assays with various flavonoid aglycones and UDP-sugars. Reaction products were identified by HPLC, and kinetic parameters (K_m, V_{max}, k_{cat}, k_{cat}/K_m) were determined. 【Result】 *CjUGT10* belongs to the *UGT73* family and contains the highly conserved PSPG-box, with E and Q at positions 43 and 44, respectively. It is predominantly expressed in leaves. Enzyme assays demonstrated that *CjUGT10* exclusively uses UDP-glucose as the sugar donor and exhibits dual regioselectivity. It catalyzes 7-OH glucosylation of pectolinarigenin, luteolin, and hispidulin, as well as 4′-OH glucosylation of cirsimaritin, yielding four major bioactive flavonoid glucosides.

收稿日期：2026-02-05

基金项目：广东省自然科学基金项目（2024A1515010381），广东省现代农业产业技术体系创新团队建设项目（南药产业技术体系）（2026CXTD24），湖南省中医药合成生物学重点实验室开放课题（HCSW2024-02），广州市科技计划项目（2025B03J0144）

*通信作者：马东明 madm@gzucm.edu.cn

Kinetic analysis revealed the highest catalytic efficiency (k_{cat}/K_m=2.82 L/(μmol·s)) toward luteolin.【Conclusion】*CjUGT10* is a multifunctional flavonoid UGT with broad substrate acceptance and flexible site selectivity. It plays a central role in the biosynthesis of pharmacologically important flavonoid glycosides in *C. japonicum*.

Keywords: *Cirsium japonicum* Fisch. ex DC.; glycosyltransferase; flavonoid glycoside biosynthesis; gene cloning; functional identification; enzyme kinetics

类黄酮糖基化是调控植物次生代谢物活性、稳定性和水溶性的关键修饰步骤，由尿苷二磷酸糖基转移酶（UGT）催化完成[1-2]。近年来，随着合成生物学与代谢工程的发展，植物UGT已成为构建高值黄酮苷微生物细胞工厂的核心元件。大蓟（*Cirsium japonicum* Fisch. ex DC.）作为传统药用菊科植物[3]，富含多种具有显著生物活性的黄酮苷，其临床疗效远超传统“止血[4]”范畴。除药典收载的柳穿鱼叶苷（Pectolinarin）外[5]，近年研究发现，木犀草素-7-O-葡萄糖苷（linarin）、蓟黄素-4′-O-葡萄糖苷（cirsimarin）及高车前素-7-O-新橙皮糖苷（HN）等成分亦表现出强效抗氧化、抗晚期糖基化终产物（AGEs）、抗炎及肝肾保护作用，尤其在糖尿病并发症、炎症性肠病（IBD）及慢性器官炎症中展现出治疗潜力[6-9]。这些多靶点、多通路的药理活性与其结构多样性密切相关，而糖基化修饰正是决定其功能特异性的关键环节。

尽管UGT家族在苦荞[10]、葡萄[11]、红花[12-14]等物种中已有系统研究，近3年多项工作聚焦于黄酮7-O-糖基转移酶的功能挖掘与工程改造[15-16]，但大蓟中负责催化上述多种黄酮骨架（柳穿鱼黄素、木犀草素、蓟黄素、高车前素）糖基化的*UGT*基因尚未被系统鉴定[17]。现有研究多局限于单一底物或体外粗提物活性检测，缺乏对底物广谱性、位点特异性及酶动力学参数的定量解析，更未建立UGT功能与多黄酮苷代谢网络的关联[16]，制约了大蓟活性成分的定向合成与资源可持续利用。

课题组前期通过转录组筛选获得多个大蓟*UGT*候选基因，其中*CjUGT10*在叶片中高表达，且与多种黄酮苷积累呈共定位趋势[18]。基于此，本研究聚焦*CjUGT10*，综合运用原核表达、体外酶活测定、HPLC产物鉴定及酶动力学分析，系统评估其对四种核心黄酮底物（柳穿鱼黄素、木犀草素、蓟黄素、高车前素）的催化能力与糖供体偏好性。为后续通过蛋白质工程优化或构建合成生物学平台实现高值黄酮苷的绿色制造提供核心工具酶与理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试大蓟植株种植于广东省广州市广州中医药大学时珍山苗圃地，经广州中医药大学中药学院马东明研究员鉴定为菊科蓟属植物大蓟（*Cirsium japonicum* Fisch. ex DC.），在花盛开时期剪取大蓟的新鲜茎、叶、花、花蕾样本（图1），用液氮速冻后存于-80 ℃冰柜，用于提取RNA，每个部位样品均设置3个生物学重复。

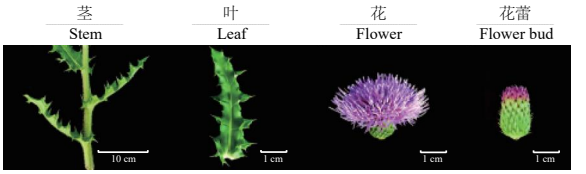


图1 大蓟不同部位植物材料

Fig. 1 Samples from different tissues of *C. japonicum*

1.1.2 菌株与载体 大肠杆菌感受态细胞*E. coli* DH5α、表达菌株BL21(DE3)和农杆菌感受态细胞GV3101均购自上海唯地生物技术有限公司；pLB克隆载体购自天根生化科技（北京）有限公司；pMAL-c5x载体（含MBP标签）、pEAQ-HT植物瞬时表达载体为实验室自存。

1.2 方法

1.2.1 *CjUGT10*生物信息学分析 本研究基于课题组前期鉴定的功能明确的类黄酮糖基转移酶（野菊*CiUGT11*[19]）为查询序列，结合大蓟转录组数据及其系统发育关系与表达水平，最终筛选出一个高同源性、高表达的*UGT73*家族成员*CjUGT10*。该基因全长序列已提交至NCBI GenBank数据库，登录号为PX578358。

首先采用NCBI ORF Finder预测开放阅读框；ExPASy-ProtParam分析蛋白质基本理化性质；SOPMA

预测二级结构；SWISS-MODEL构建三级结构同源模型并评估GMQE值；通过InterPro与MEME-Suite分析保守结构域与基序；NetOGlyc 4.0预测糖基化修饰位点；DNAMAN软件进行多序列比对；MEGA 11软件采用邻接法（Bootstrap=1 000）构建系统发育树；TMHMM 2.0预测跨膜结构域；SignalP 6.0分析信号肽；ExPASy- ProtScale计算亲疏水性（GRAVY）；Plant-mPLoc预测亚细胞定位。

1.2.2　总RNA提取与*CjUGT10*基因克隆　选取花盛开期的健康大蓟，分别采集新鲜茎、叶、花、花蕾组织，液氮立即速冻、研磨成细粉，通过植物总RNA提取试剂盒提取总RNA，通过琼脂糖凝胶电泳验证完整性，超微量紫外分光光度计检测纯度。以总RNA为模板，用FastKing cDNA第一链合成试剂盒反转录获得cDNA。根据本大蓟基因组数据库设计*CjUGT10*的特异性引物（表1），由广州擎科生物科技股份有限公司合成。以cDNA为模板进行PCR扩增。PCR体系（25 μL）：12.5 μL PrimeSTAR Max Premix，上、下游引物各1 μL，cDNA模板1 μL，无酶水9.5 μL。反应程序：98 ℃预变性2 min；98 ℃变性15 s，（Tm−5）℃退火30 s，72 ℃延伸90 s，38个循环；72 ℃终延伸5 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后，对目的片段进行胶回收并连接至pLB克隆载体，转化至DH5α感受态细胞，经氨苄青霉素抗性筛选、菌落PCR鉴定及测序验证后，保留阳性重组质粒。

表1　本研究使用的引物序列

Table 1　Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5′−3′)	用途 Purpose
CjUGT10-F	ATGATTGAACATAGATTCAATCACTCCACCCC	ORF序列扩增
CjUGT10-R	TTAGCTTAATTTCCCAGCACTGGCT	
pMAL-Cj10-F	GAAGGATTTCACATATGATGGCTTCCAATCTTCACTTTCTTGT（*Ned* I）	ORF序列扩增
pMAL-Cj10-R	GTTTTATTTGAAGCTTTTAGCCAGCCAAGCCCTTATTTTTATG（*Hind* III）	
qCjGAPDH-F	TCATGGCCAATGGAAGCACA	大蓟内参基因
qCjGAPDH-R	ACCACCCTTCAAGTGAGCAG	
qGlcT10-F	CTCTCTTGATCCGTGGGTGG	实时荧光定量PCR
qGlcT10-R	GCTCCTGAAACTGAGGCCAT	

1.2.3　RT-qPCR分析组织表达模式　以*GAPDH*为内参基因，设计*CjUGT10*荧光定量引物（表1）。RT-qPCR体系（20 μL）：TB Green Premix Ex Taq II酶10 μL，cDNA模板2 μL，上、下游引物各0.4 μL，无酶水7.2 μL。每个样品设置3个生物学重复与3个技术重复。由Bio-Rad CFX96实时定量RT-qPCR仪进行分析并生成阈值（Ct值），反应程序：94 ℃预变性30 s；94 ℃变性30 s，60 ℃退火30 s，39个循环；溶解曲线分析65–95 ℃，0.5 ℃/5 s。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算相对表达量，GraphPad Prism 9.1.4软件绘制组织表达柱形图。

1.2.4　*CjUGT10*重组表达载体构建　设计同源臂引物（表1），通过In-Fusion同源重组法将*CjUGT10*片段插入pMAL-c5x载体，得到重组表达载体pMAL-*CjUGT10*并转化至DH5α感受态细胞，经氨苄青霉素抗性筛选、菌落PCR及测序验证后，获得阳性重组质粒。

1.2.5　原核表达及蛋白纯化　将pMAL-*CjUGT10*重组质粒转化至BL21(DE3)感受态细胞，挑取阳性单菌落接种至含氨苄青霉素的LB液体培养基，37 ℃、220 r/min培养至OD_{600}≈0.6，加入终浓度0.1 mmol/L的IPTG，16 ℃、220 r/min诱导表达16–20 h。离心收集菌体，用MBP缓冲液重悬后超声破碎，13 000 ×*g*离心20 min收集上清粗酶液。用Dextrin Beads 6FF亲和色谱柱，依次进行收集流穿液、洗杂液和洗脱液等纯化操作，洗脱产物经PD10脱盐柱脱盐。取粗酶液、流穿液、洗杂液、洗脱液及脱盐后样品各20 μL，加入5 μL 5×SDS loading buffer，95–98 ℃变性10 min，使用SDS-PAGE检测重组蛋白纯度与条带分布情况，通过BCA法测定蛋白浓度，经酶标仪测定

吸光度后计算得到具体蛋白含量。

1.2.6 体外酶促反应及色谱分析 以UDP-葡萄糖为糖基供体，选取柳穿鱼黄素、蓟黄素、木犀草素、高车前素、金合欢素、山柰酚、染料木素与柚皮素等8种黄酮类化合物为受体，验证*CjUGT10*重组蛋白的体外催化能力。通过比较反应组与灭活对照组的HPLC结果，判断是否有新产物生成；并利用已知的对应黄酮糖苷标准品作为参照，确定产物保留时间。

酶促反应体系（200 μL）：50 mmol/L Tris-HCl（pH 7.4），4 μL 100 mmol/L DTT，10 μL 100 mmol/L $MgCl_2$，4 μL 100 mmol/L UDP-葡萄糖，20 μL 1 mmol/L黄酮底物，80 μg重组蛋白，每组设3个生物学重复。设置灭活对照组（重组蛋白100 ℃水浴10 min），37 ℃孵育3 h后，加入300 μL预冷甲醇终止反应，13 000 ×*g*离心8 min。上清经0.22 μm滤膜过滤后用于HPLC分析，流动相A为0.1%甲酸水溶液、B为乙腈，进样量10 μL，流速1 mL/min，柱温30 ℃；梯度洗脱程序：0–5 min，5%–15% B；5–12 min，15%–31% B；12–15 min，31%–38% B；15–20 min，38%–60% B；20–21 min，60%–70% B；21–25 min，15% B；检测波长330 nm（黄酮类通用检测波长）。

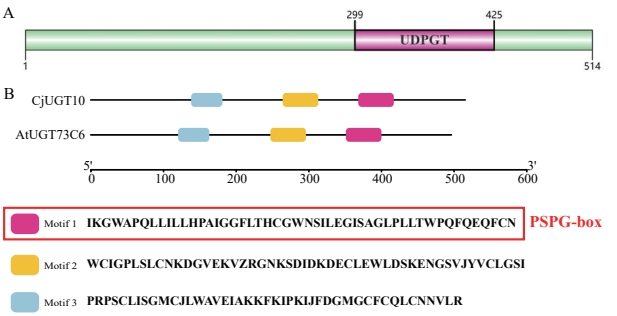
1.2.7 酶学性质分析 通过HPLC建立以上底物的标准曲线，所有标准曲线均符合R^2>0.995，定量分析其催化的糖基化产物转化率。针对*CjUGT10*对不同底物的催化活性差异，设置不同底物浓度梯度（5、10、20、30、40、50、80、100、125、150 μmol/L），柳穿鱼黄素、蓟黄素为底物时蛋白用量为5 μg，高车前素、木犀草素为底物时蛋白用量2 μg，反应时间0.25 h，其余条件同“1.2.6”，每组设3个生物学重复。通过HPLC检测获取数据后，拟合米氏方程，计算动力学参数V_{max}、K_m、K_{cat}及K_{cat}/K_m，使用GraphPad Prism中Michaelis-Menten模型进行非线性回归分析。

2 结果

2.1 生物信息学分析

2.1.1 基因序列与蛋白理化性质分析 *CjUGT10*基因开放阅读框全长1 545 bp，编码514个氨基酸残基，蛋白分子量为57.6 kD、等电点为5.57，不稳定系数为45.97（>40），这些参数均处于植物UGT家族常见范围内。

2.1.2 保守基序分析 通过NCBI CD-Search与InterPro数据库分析，确认*CjUGT10*含有Glycosyltransferase_GTB-type超家族结构域及UGT家族特征结构域UDPGT（Pfam accession：PF00201）（图2-A）。进一步利用MEME-Suite进行保守基序预测（图2-B），发现其含有多个功能相关基序，其中Motif1对应经典的PSPG-box（44个氨基酸），呈现“WAPQ……EQ”典型特征。上述保守结构域与保守基序的存在，表明*CjUGT10*具备典型的植物UGT特征，支持其参与糖基化反应的功能属性。



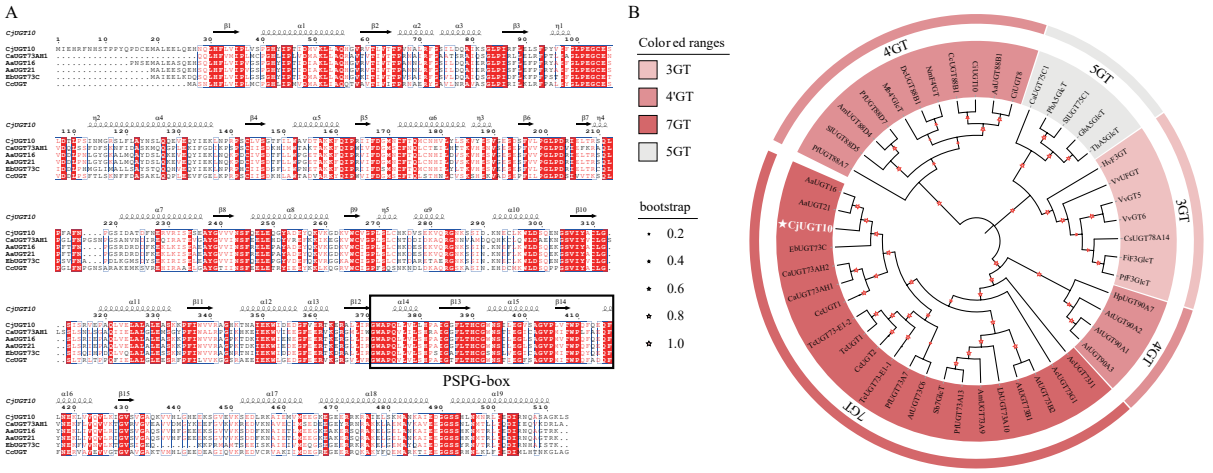
A图中紫色区域为UGT家族特征结构域PF00201；B图中红框为PSPG保守序列

The purple region indicates the characteristic domain PF00201 of the UGT family in figure A; and the red box indicates PSPG-box in figure B

图2 *CjUGT10*的结构域组成（A）和保守基序分布（B）

Fig. 2 Domain architecture (A) and conserved motifs (B) of *CjUGT10*

2.1.3 多序列比对与进化关系分析 *CjUGT10*与UGT73家族成员多序列比对的一致性在不同区域存在差异，整体平均一致性约为73.5%，且所有序列均高度保守地包含PSPG-box（图3-A，黑色框），第43位和第44位均为以UDP-葡萄糖为糖供体的指示性氨基酸E和Q。采用MEGA 11软件构建邻接（NJ）法系统发育树（Bootstrap=1 000），将*CjUGT10*与其他已知功能的UGT蛋白进行聚类（图3-B）。根据底物催化特异性及亲缘关系，UGTs可分为类黄酮3-OH OGTs、类黄酮5-OH OGTs、类黄酮4′-OH OGTs、类黄酮7-OH OGTs四类。结果显示，*CjUGT10*与类黄酮7-OH OGTs聚类在同一分支，Bootstrap支持率高达89%。综上，*CjUGT10*是大蓟中一个属于UGT73



A图中黑框为UGT73家族PSPG保守结构域

The black box in figure A represents PSPG conserved domains of UGT73 family

图3　*CjUGT10*与UGT73家族成员多序列比对(A)和系统发育树分析(B)

Fig. 3　Multiple sequence alignment (A) and phylogenetic tree analysis (B) of *CjUGT10* and UGT73 family

家族的新同源基因，可能具有类黄酮7-OH位糖基化功能。

2.1.4　蛋白质结构特征分析　SOPMA二级结构预测结果显示（图4-A），CjUGT10蛋白以α-螺旋（占比约39.3%）和无规则卷曲（占比约47.3%）为主。使用SWISS-MODEL构建的同源三维结构模型（图4-B），GMQE值为0.89。NetOGlyc 4.0预测发现CjUGT10存在5个潜在O-糖基化位点（第9、10、64、278、288位氨基酸）。进一步通过TMHMM 2.0和SignalP 6.0分析，CjUGT10未检测到跨膜结构域或信号肽（信号肽概率为0）。ExPASy-ProtScale在线分析该蛋白为亲水性蛋白（GRAVY=-0.161），脂肪族指数达96.48。结合Plant-mPLoc等亚细胞定位工具预测，CjUGT10可溶性概率>0.8，主要定位于细胞质。

2.2　大蓟各组织总RNA提取及*CjUGT10*组织表达模式分析

采用RT-qPCR检测*CjUGT10*基因在大蓟不同组织部位中表达情况（图5）。结果显示，*CjUGT10*在叶中表达量显著高于其他组织（P<0.000 1），较其他组织部位高出2倍以上，而在茎、花和花蕾中表达极低。这种组织表达分化与大蓟中黄酮苷的积累模式存在部分对应关系，推测*CjUGT10*可能参与叶中光合副产物的糖基化，调节次生代谢物的储存或转运。

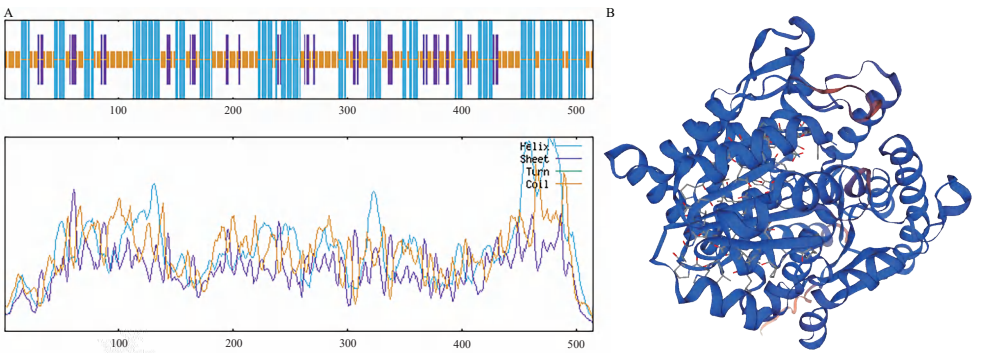


图4　CjUGT10二级结构预测(A)和三级结构预测(B)

Fig. 4　Secondary structure prediction (A) and tertiary structure prediction (B) of CjUGT10

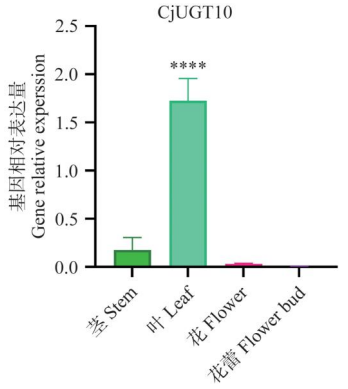


图5 *CjUGT10*组织表达模式

Fig. 5 Tissue expression pattern of *CjUGT10*

2.3 *CjUGT10*基因克隆与表达载体构建

2.3.1 *CjUGT10*目的片段克隆 以反转录得到的cDNA为模板进行PCR扩增，扩增产物在约1 482 bp处出现清晰条带（图6-A），长度与*CjUGT10*基因编码区开放阅读框大小一致。经胶回收、连接至pLB克隆载体，转化至DH5α感受态细胞，经氨苄青霉素抗性筛选、菌落PCR鉴定及测序验证后，获得阳性重组质粒。

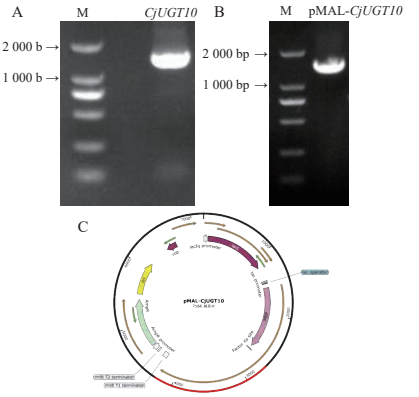
2.3.2 pMAL-*CjUGT10*重组载体构建 成功将阳性克隆所得的目的片段插入至pMAL-c5X表达载体中，构建重组表达质粒pMAL-*CjUGT10*。经测序验证，目的基因插入位置正确，序列与基因组模板匹配（图6-B）。载体图谱显示，*CjUGT10*基因位于MBP融合标签下游，具备正确的启动子和终止子结构（图6-C）。

2.4 CjUGT10蛋白表达与纯化

纯化所得蛋白经SDS-PAGE分析显示（图7），在约97.6 kD处出现特异性条带，与MBP标签蛋白（约40 kD）和*CjUGT10*理论分子量（57.6 kD）之和基本一致。该蛋白在上清中以可溶形式高效表达（Lane 1），经MBP亲和层析后，目标蛋白几乎完全结合于柱上（Lane 2–3无明显条带），并在洗脱液中获得高纯度产物（Lane 4）；PD10脱盐后样品条带单一、背景干净（Lane 5）。经BCA法测定，最终蛋白浓度达1.2 mg/mL，可用于后续实验。

2.5 CjUGT10酶学性质分析

2.5.1 底物宽泛性与糖基化位点鉴定 在以UDP-葡萄糖为糖供体的反应体系中，CjUGT10与多种黄酮类化合物共孵育后，HPLC谱图中均出现与底物峰（Peak 1）保留时间不同的新峰（Peak 2或Peak 3），而灭活对照组中未检测到这些新峰（图8）。进一步对比各底物反应谱图发现：柳穿鱼黄素、蓟黄素、高车前素、木犀草素、金合欢素和山奈酚在反应组中均出现显著的Peak 2，其保留时间与已知的7-O-葡萄糖苷标准品高度一致；与蓟黄素反应产物的Peak 2，其保留时间与蓟黄素的4′-O-葡萄糖苷标准

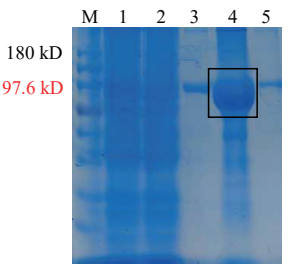


A: *CjUGT10*基因PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图，M为DL2000 DNA标记；B: pMAL-*CjUGT10*重组表达载体的菌落PCR鉴定结果，M为DL2000 DNA标记；C: pMAL-*CjUGT10*重组质粒的结构图

A: Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified *CjUGT10* gene, M: DL2000 DNA marker. B: Colony PCR results of the pMAL-*CjUGT10* recombinant expression vector. M: DL2000 DNA marker. C: The plasmid map of pMAL-*CjUGT10*

图6 *CjUGT10*基因克隆（A）与载体构建（B）

Fig. 6 Cloning of *CjUGT10* gene (A) and vector construction (B)



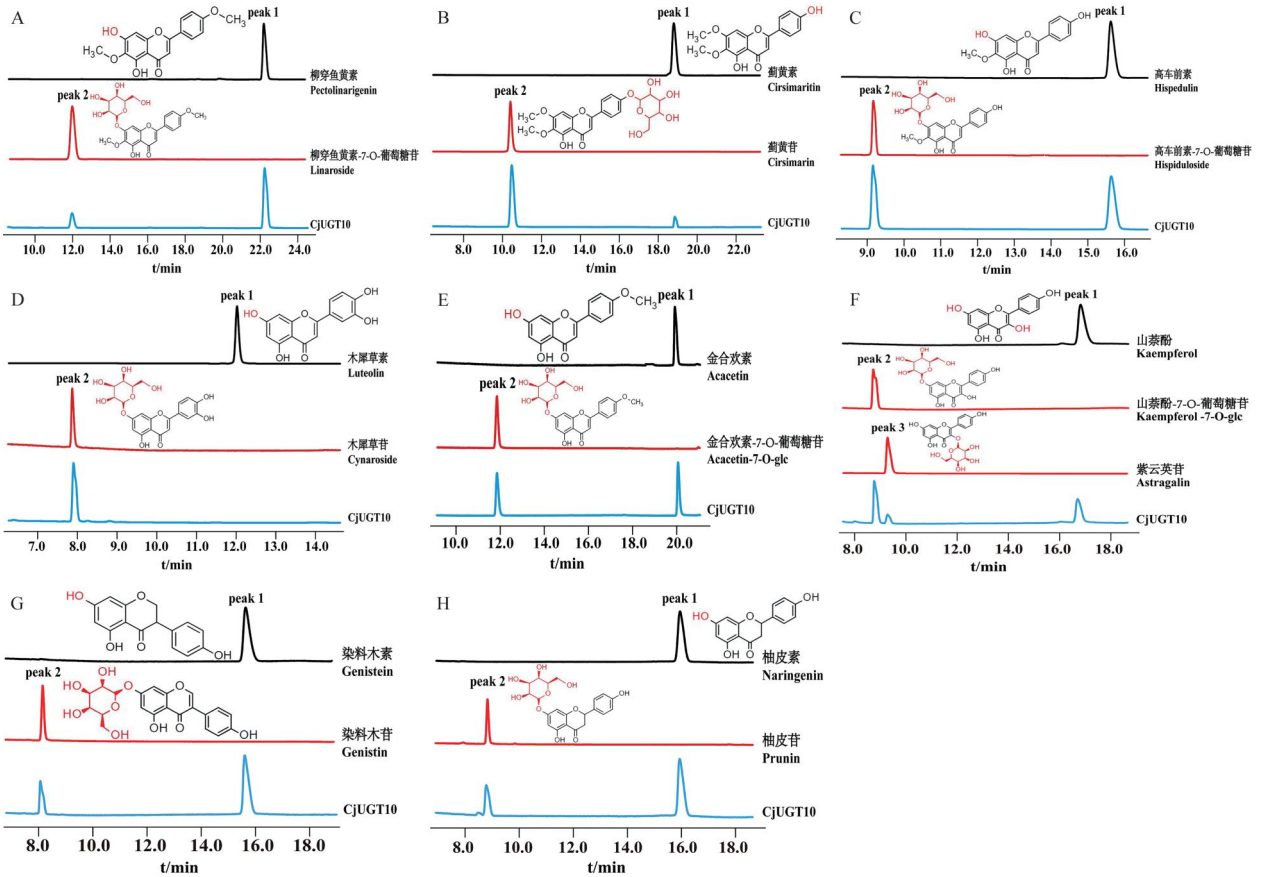
M: 蛋白质分子量标准；1: 上清蛋白；2: 流穿液；3: 洗杂液；4: MBP洗脱液；5: PD10脱盐后蛋白

M: Protein marker; 1: supernatant protein; 2: flow-through fraction; 3: wash fraction; 4: MBP-tagged protein elution; 5: protein after PD10 desalting

图7 CjUGT10重组蛋白的SDS-PAGE分析

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of recombinant CjUGT10 protein

品匹配；山奈酚反应产物中除Peak 2外，还出现Peak 3，其保留时间与山奈酚3-O-葡萄糖苷标准品相同。上述结果表明，*CjUGT10*具有较宽的底物接受性，能够催化多种类黄酮发生糖基化反应，并展现出对7-OH、4′-OH和3-OH位点的选择性修饰能力。



A–H：分别为8种黄酮底物的酶促反应HPLC谱图。黑线：对照组；红实线：标准品；蓝实线：反应组。Peak 1：底物；Peak 2：7-O-或4′-O-葡萄糖苷；Peak 3：山萘酚-3-O-葡萄糖苷

A–H: HPLC chromatograms of enzymatic reactions with eight flavonoid substrates, respectively. Black: Control; red: standard; blue: reaction. Peak 1: Substrate; Peak 2: 7-O- or 4′-O-glucoside; Peak 3: kaempferol-3-O-glucoside

图8　*CjUGT10*对8种黄酮底物的体外酶活反应HPLC谱图

Fig. 8　HPLC profiles of *in vitro* enzymatic reactions of *CjUGT10* with eight flavonoid substrates

2.5.2　底物偏好性鉴定　为系统评估*CjUGT10*的底物偏好性，基于HPLC建立的标准曲线对其在8种黄酮类化合物上的转化率进行定量分析（图9）。结果显示，*CjUGT10*对木犀草素的转化率最高（92.52%±0.41%），远高于其他底物，初步体现对该黄酮骨架的明显偏好；其次为山萘酚（65.31%±0.91%）、金合欢素（57.60%±0.14%）和蓟黄素（51.53%±0.19%）；而对染料木素（33.81%±0.78%）、高车前素（28.84%±0.05%）、柚皮素（17.88%±0.59%）及柳穿鱼黄素

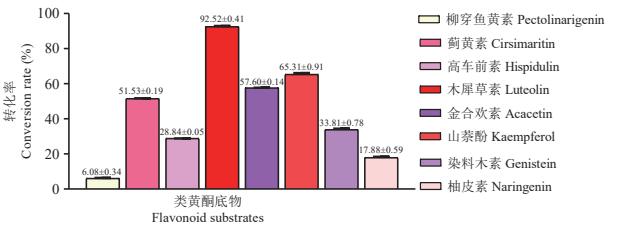


图9　*CjUGT10*对8种黄酮底物的转化率

Fig. 9　Conversion rates of *CjUGT10* for eight flavonoid substrates

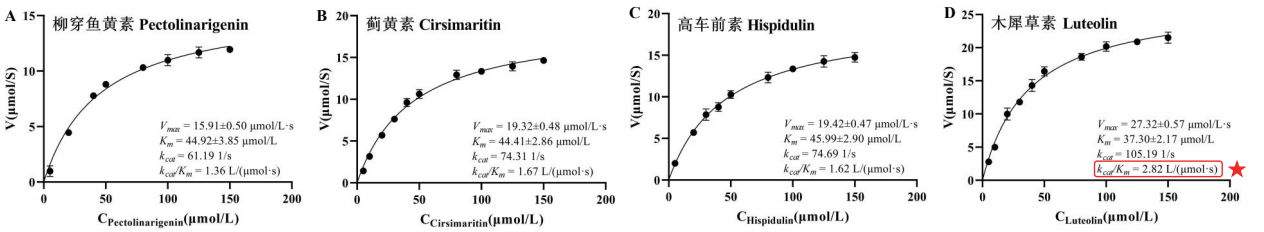
（6.08%±0.34%）的转化率较低。

2.5.3 *CjUGT10*动力学规律分析 为进一步揭示其催化机制，选取柳穿鱼黄素、蓟黄素、高车前素和木犀草素4种代表性底物进行酶动力学分析（图10-A–D），所有动力学曲线均能良好拟合米氏方程（R^2>0.995）。

具体参数显示，木犀草素具有最小的K_m值（37.30±2.17 μmol/L）和最大的V_{max}（27.32±0.57 μmol/L·s），且k_{cat}/K_m达2.82 L/（μmol·s），显著高于其他底物，结合“2.5.2”的转化率数值，初步推测木犀草素为*CjUGT10*最优底物。相比之下，蓟黄素虽具有较高的转化率，但K_m（44.41 ± 2.87 μmol/L）较大，V_{max}（19.32 ± 0.48 μmol/L·s）也相对较低，导致其k_{cat}/K_m仅为1.67 L/(μmol·s)；高车前素的K_m值（45.99±2.90 μmol/L）、V_{max}值（19.42±0.47 μmol/L·s）以及k_{cat}/K_m值（1.62 L/(μmol·s)），与蓟黄素较为接近；而柳穿鱼黄素的k_{cat}/K_m值最低，仅为1.36 L/(μmol·s)。

3 讨论

本研究系统鉴定了大蓟中UGT73家族成员*CjUGT10*的功能特征，揭示其为UDP-葡萄糖依赖型，以7-OH位为主要修饰位点，可催化蓟黄素的4′-OH位以及山柰酚的3-OH和7-OH位糖基化的多位点葡萄糖基转移酶，且对多种类黄酮骨架有催化作用。尽管其对大蓟的核心药效成分柳穿鱼黄素的体外转化率较低（6.08%），但对木犀草素表现出极高的亲和力（K_m=37.3 μmol/L）与催化效率（k_{cat}/K_m=2.82 L/(μmol·s)），且能广谱识别多种黄酮底物，这种“主效7-OH+次效多羟基位点”的催化模式，使其成为连接多个黄酮分支通路的关键节点。



A–D：分别为*CjUGT10*对柳穿鱼黄素、蓟黄素、高车前素和木犀草素的酶动力学曲线；V_{max}：最大反应速率（μmol/L·s）；K_m：米氏常数（μmol/L）；k_{cat}：催化常数（1/s）；k_{cat}/K_m：催化效率（L/（μmol·s））

A–D: The kinetic curves of *CjUGT10* with pectolinarigenin, cirsimaritin, hispidulin, and luteolin, respectively. V_{max}: Maximum reaction rate (μmol/L·s); K_m: Michaelis constant (μmol/L); k_{cat}: turnover number (1/s); k_{cat}/K_m: catalytic efficiency (L/(μmol·s))

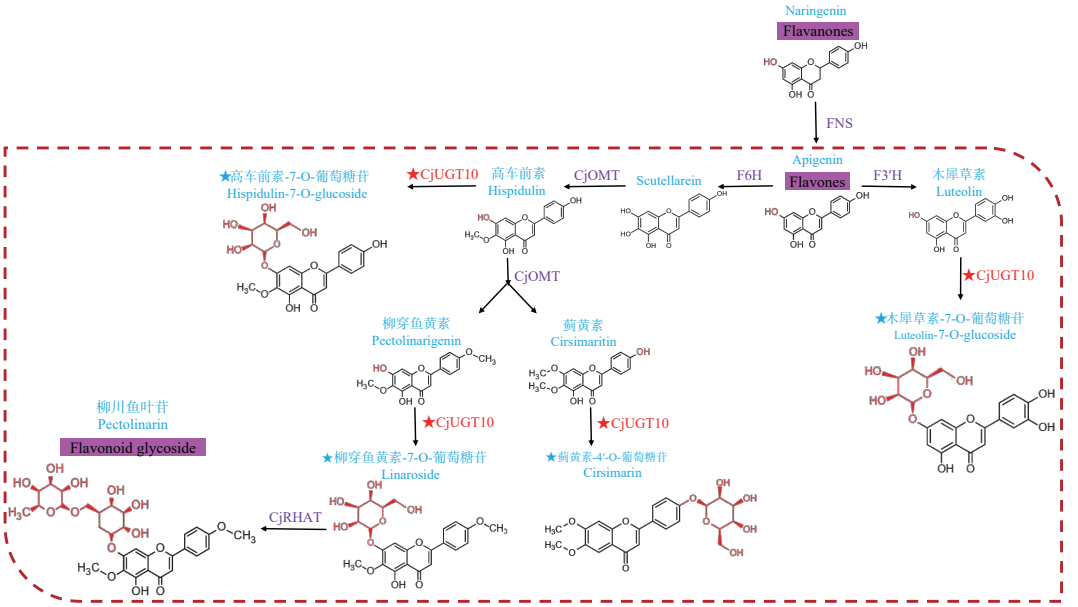
图10 *CjUGT10*对4种黄酮底物的酶动力学曲线

Fig. 10 Kinetic curves of *CjUGT10* with four flavonoid substrates

*CjUGT10*的PSPG-box保守序列与β/α/β Rossmann折叠结构域为其底物识别与催化提供了稳定基础[20]。系统发育分析显示其聚类于类黄酮7-OH OGTs分支，与其7-OH位点特异性高度一致[21]。尽管其体外活性有限，但其在植物体内可能通过与其他酶（如黄酮合成酶复合物）或特定亚细胞区室（如内质网膜）的物理耦合实现高效底物捕获，从而克服低催化效率的限制[22]。类似现象已在拟南芥*AtUGT78D2*中被报道[23–24]，该酶虽体外活性微弱，却因与黄酮合成酶共定位而在体内发挥关键作用。因此，*CjUGT10*可能通过“空间耦合机制”实现对黄酮代谢流的定向调控[25–26]，而这种调控机制可能是*CjUGT10*在体内发挥关键作用的重要原因。

值得注意的是，*CjUGT10*在叶片中mRNA表达较高，而其催化产物柳穿鱼黄素-7-O-葡萄糖苷却在花蕾中富集程度最高[27]，达（2 180.40±936.50）μg/g，叶中含量仅为（123.99±4.94）μg/g，这一差异表明花蕾中可能存在更适宜的微环境或更高活性的酶体系来促进中间产物的稳定与终产物的积累。该现象呈现出典型的“合成起始地”与“终产物储存地”空间分离的代谢格局，提示大蓟体内可能存在跨组织的代谢转运过程[28]。结合其底物广谱性、酶学数据与组织表达特征，我们构建了*CjUGT10*介导的

4种关键黄酮苷合成路径模型（图11），以柚皮素为共同前体，清晰展示了该酶对不同黄酮骨架的7-OH和4′-OH葡萄糖基化作用，直观呈现其作为多通路交汇节点的功能定位。该模型不仅整合了本研究的酶学与表达数据，也为后续解析大蓟黄酮苷生物合成网络提供了可视化框架[29-30]。



红色星号标示*CjUGT10*催化的葡萄糖基化位点。该图展示了*CjUGT10*在大蓟中参与合成柳穿鱼黄素-7-O-葡萄糖苷、蓟黄素-4′-O-葡萄糖苷、木犀草素-7-O-葡萄糖苷和高车前素-7-O-葡萄糖苷的4条路径。上游反应参考已报道黄酮通路[31-32]，*CjUGT10*催化步骤经本研究验证

Red stars indicate *CjUGT10*-catalyzed glucosylation sites. The schematic shows four biosynthetic pathways in *C. japonicum* leading to the production of pectolinarigenin-7-O-glucoside, cirsimaritin-4′-O-glucoside (Cirsimarin), luteolin-7-O-glucoside, and hispidulin-7-O-glucoside. Upstream steps are based on previously reported flavonoid biosynthesis pathways[31-32]; and *CjUGT10*-mediated reactions were validated in this study

图11　*CjUGT10*介导的大蓟4种重要黄酮苷生物合成路径

Fig. 11　Proposed biosynthetic routes of four key flavonoid glucosides mediated by *CjUGT10 in C. japonicum*

与多数具有高度底物专一性的UGT不同，*CjUGT10*展现出显著的底物灵活性[33]。其不仅能催化柳穿鱼黄素生成柳穿鱼叶苷前体，还可高效修饰木犀草素生成木犀草苷，并对蓟黄素、高车前素等结构相近底物具有活性，这一特性在已报道的植物UGT中较为罕见。近年来，多项研究聚焦于植物UGT的功能鉴定与工程改造[25，34-36]。例如，辣椒中*UGT*基因家族的系统鉴定揭示了其在多糖糖基化中的作用[37]；灰毡毛忍冬中*UGTPg17*、*UGTPg36*的克隆则表明UGT在皂苷合成中的重要性[38]。然而，这些研究多局限于单一底物或特定化合物类别。相比之下，本研究首次系统解析了一个UGT对4种关键黄酮底物的催化能力，揭示其在复杂代谢网络中的枢纽地位[39]。这不仅丰富了对UGT功能多样性的认知，也为理解菊科植物次生代谢的协同调控机制提供了新视角[40]。需要指出的是，本研究仅基于成熟植株的组织表达谱进行分析，尚未涵盖不同发育阶段的动态变化；同时，*CjUGT10*的体内生物学功能亦未通过遗传转化手段加以验证。这些局限提示，当前对*CjUGT10*在大蓟黄酮代谢网络中的时空调控角色的理解仍属初步。

基于上述发现与不足，未来工作可从以下3个方面展开：首先，体内功能验证方面，通过烟草瞬时表达体系[41]，在活体环境中检测*CjUGT10*对各底物的转化效率及产物积累情况，明确其在真实代谢背景下的作用；其次，协同酶系筛选方面，结合转录组共表达网络与CRISPR/Cas9基因编辑[42]，筛选花蕾中可能负责柳穿鱼叶苷高效合成的下游UGT同工酶，完善大蓟黄酮苷合成通路；最后，蛋白质工程改造方面[43]，利用同源建模与分子对接指导理

性设计，优化其活性口袋以增强其对特定黄酮骨架的识别能力；同时结合定向进化策略，提升其催化效率与底物特异性。

最终，通过对*CjUGT10*及其协同酶系的深入解析与工程化，有望构建高效的微生物细胞工厂，实现柳穿鱼叶苷等大蓟核心药效成分的绿色、可持续合成，推动中药合成生物学从基础研究走向产业化应用。

4 结论

克隆并鉴定了大蓟类黄酮糖基转移酶基因*CjUGT10*，证实其为UDP-葡萄糖依赖的7-OH/4′-OH/3-OH多位点糖基转移酶，可高效催化木犀草素、柳穿鱼黄素等药效成分的O-葡萄糖基化。该酶在叶片中高表达，与其底物分布一致，参与大蓟4种关键黄酮苷的生物合成。

参考文献

[1] Guan HF, Zhang YZ, Li JS, et al. Analysis of the UDP-glucosyltransferase (UGT) gene family and its functional involvement in drought and salt stress tolerance in *Phoebe bournei* [J]. Plants, 2024, 13(5): 722.

[2] 姚宇, 顾佳珺, 孙超, 等. 植物类黄酮UDP-糖基转移酶研究进展 [J]. 生物技术通报, 2022, 38(12): 47-57.
Yao Y, Gu JJ, Sun C, et al. Advances in plant flavonoids UDP-glycosyltransferase [J]. Biotechnol Bull, 2022, 38(12): 47-57.

[3] 李敏, 苗明三. 大蓟的化学、药理及临床应用特点 [J]. 中医学报, 2016, 31(2): 262-265.
Li M, Miao MS. Chemical analysis, pharmacology and clinical application characteristics of *Cirsium japonicum* [J]. Acta Chin Med, 2016, 31(2): 262-265.

[4] 赵静, 孟庆山, 荣飞, 等. 基于高效液相色谱法和多成分定量测定大蓟配方颗粒中5种有效成分 [J]. 品牌与标准化, 2025(5): 16-18.
Zhao J, Meng QS, Rong F, et al. Determination of five active components in *Cirsium japonicum* formula granules based on HPLC and multi-component quantitative [J]. Brand Stand, 2025(5): 16-18.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典——2025年版 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2025.
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2025 Edition) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2025.

[6] Lee M, Park J, Yoo H, et al. Hispidulin-7-O-neohesperidoside from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* attenuates the production of inflammatory mediators in LPS-induced raw 264.7 cells and HT-29 cells [J]. Phcog Mag, 2017, 13(52): 707.

[7] Liu PQ, Li Q, Zhu GH, et al. Characterization of the glucuronidating pathway of pectolinarigenin, the major active constituent of the Chinese medicine Daji, in humans and its influence on biological activities [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319: 117280.

[8] Patel DK. Biological importance, therapeutic benefit and analytical aspects of bioactive flavonoid pectolinarin in the nature [J]. Drug Metab Lett, 2021, 14(2): 117-125.

[9] Yoon S, Kim M, Shin S, et al. Effect of *Cirsium japonicum* flower extract on skin aging induced by glycation [J]. Molecules, 2022, 27(7): 2093.

[10] 王佳蕊, 孙培媛, 柯瑾, 等. 苦荞糖基转移酶基因*FtUGT143*的克隆及表达分析 [J]. 生物技术通报, 2023, 39(8): 204-212.
Wang JR, Sun PY, Ke J, et al. Cloning and expression analyses of C-glycosyltransferase gene *FtUGT143* in *Fagopyrum tataricum* [J]. Biotechnol Bull, 2023, 39(8): 204-212.

[11] 王媛媛, 刘云清, 徐晶宇, 等. 葡萄UDP-糖基转移酶家族的全基因组表征、进化和表达分析 [J]. 食品科学, 2025, 46(14): 134-146.
Wang YY, Liu YQ, Xu JY, et al. Genome-wide characterization, evolution and expression profiling of the UDP-glycosyltransferase family in grapes (*Vitis vinifera*) [J]. Food Sci, 2025, 46(14): 134-146.

[12] 蔡鑫博, 刘楠, 李佳, 等. 红花黄酮类糖基转移酶基因*CtUGT49*功能表征及酶学特性分析 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(24): 6624-6634.
Cai XB, Liu N, Li J, et al. Functional characterization and enzymatic properties of flavonoid glycosyltransferase gene *CtUGT49* in *Carthamus tinctorius* [J]. China J Chin Mater Med, 2023, 48(24): 6624-6634.

[13] 齐书艺, 王璐暖, 何贝轩, 等. 红花黄酮生物合成途径糖基转移酶基因*CtUGT25*的功能研究 [J]. 药学学报, 2024, 59(6): 1854-1863.
Qi SY, Wang LN, He BX, et al. Functional study of glycosyltransferase genes *CtUGT25* in the flavone biosynthesis pathway of *Carthamus tinctorius* L [J]. Acta Pharm Sin, 2024, 59(6): 1854-1863.

[14] 谭政委, 鲁丹丹, 李磊, 等. 红花类黄酮3-O-糖基转移酶基因*CtUF3GT*的克隆及功能鉴定 [J]. 药学学报, 2022, 57(8): 2543-2551.
Tan ZW, Lu DD, Li L, et al. Identification and characterization of flavonoid 3-O-glycosyltrans-ferase gene *CtUF3GT* from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) [J]. Acta Pharm Sin, 2022, 57(8): 2543-2551.

[15] Xu Y, Cao YP, Tie FF, et al. Generation of suspension cell cultures with high syringin content and anti-inflammatory activity through overexpressing glycotransferase SiUGT72BZ2 in *Saussurea involucrata* [J]. Plant Biotechnol J, 2025, 23(5): 1713-1724.

[16] Zhang RM, John Martin JJ, Liu XY, et al. Joint analysis of transcriptional metabolism for flavonoid synthesis during different developmental periods in oil palm exocarp [J]. Front Plant Sci, 2025, 16: 1530673.

[17] Shang DL, Ma QG, Wei RR. Cytotoxic phenylpropanoid glycosides from *Cirsium japonicum* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2016, 18(12): 1122-1130.

[18] Pei TL, Yan MX, Li T, et al. Characterization of UDP-glycosyltransferase family members reveals how major flavonoid glycoside accumulates in the roots of *Scutellaria baicalensis* [J]. BMC Genom, 2022, 23: 169.

[19] Deng YN, Yang P, Zhang QL, et al. Genomic insights into the evolution of flavonoid biosynthesis and O-methyltransferase and glucosyltransferase in *Chrysanthemum indicum* [J]. Cell Rep, 2024, 43(2): 113725.

[20] Aubuchon LN, Schmiederer K, Lee SG. Comparative structural analysis of plant uridine diphosphate (UDP)-dependent glycosyltransferases (UGTs) in plant specialized metabolism: structures of plant UGTs for biosynthesis of steviol glycosides [J]. Phytochem Rev, 2023, 22(2): 385-406.

[21] Petrich J, Alvarez CE, Gómez Cano L, et al. Functional characterization of a maize UDP-glucosyltransferase involved in the biosynthesis of flavonoid 7-O-glucosides and di-O-glucosides [J]. Plant Physiol Biochem, 2025, 221: 109583.

[22] Tian SL, Yang YY, Wu T, et al. Functional characterization of a flavone synthase that participates in a kumquat flavone metabolon [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 826780.

[23] Yang F, Zhang L, Zhang X, et al. Genome-wide investigation of UDP-Glycosyltransferase family in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) [J]. BMC Plant Biol, 2024, 24: 249.

[24] Soubeyrand E, Latimer S, Bernert AC, et al. 3-O-glycosylation of kaempferol restricts the supply of the benzenoid precursor of ubiquinone (Coenzyme Q) in *Arabidopsis thaliana* [J]. Phytochemistry, 2021, 186: 112738.

[25] Zhang CB, Shi JC, Deng R, et al. Plant natural product biosynthesis through metabolon engineering [J]. J Integr Plant Biol, 2026, 68(4): 967-984.

[26] Yu KJ, Song YS, Lin JX, et al. The complexities of proanthocyanidin biosynthesis and its regulation in plants [J]. Plant Commun, 2023, 4(2): 100498.

[27] Ye YN, Chen ZL, Wu YL, et al. Purification process and *in vitro* and *in vivo* bioactivity evaluation of pectolinarin and linarin from *Cirsium japonicum* [J]. Molecules, 2022, 27(24): 8695.

[28] Xu P, Li JH, Chen CT, et al. Integrated transcriptomic and metabolomic analyses reveal tissue-specific accumulation and expression patterns of monoterpene glycosides, gallaglycosides, and flavonoids in *Paeonia lactiflora* Pall [J]. BMC Genom, 2025, 26: 561.

[29] Verma B, Arora P, Hussain S, et al. UGT708 glycosyltransferases: Nature's architects of C-glycosides [J]. Biotechnol Adv, 2026, 87: 108787.

[30] Wang YM, Zhang JX, Wang P, et al. Integrated transcriptomic and metabolomic analysis reveals tissue-specific flavonoid biosynthesis and MYB-mediated regulation of UGT71A1 in *Panax quinquefolius* [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(6): 2669.

[31] Wang RJ, Wang C, Du JK. Plant UGTs: Functional diversity, catalytic mechanisms and rational design for metabolic engineering [J]. Biotechnol Adv, 2026, 89: 108872.

[32] de Barros Rates A, Cesarino I. Pour some sugar on me: The diverse functions of phenylpropanoid glycosylation [J]. J Plant Physiol, 2023, 291: 154138.

[33] Ren CH, Qian JF, Wang YC, et al. Flavonoid UDP-glycosyltransferase in plants: functional identification, substrate recognition mechanism, and biotechnology application [J]. Phytochem Rev, 2025, 24(5): 4451-4474.

[34] Li XF, Wei F, Quan CQ, et al. Identification of key modules and genes in response to high-temperature stress in *Platostoma palustre* based on WGCNA [J]. BMC Plant Biol, 2025, 25: 695.

[35] Liu J, Wang JX, Chen MJ, et al. Multi-omics analyses uncover the mechanism underlying polyploidization-enhanced steviol glycosides biosynthesis in *Stevia rebaudiana* [J]. Plants, 2024, 13(18): 2542.

[36] Yin XJ, Xiang YP, Huang FQ, et al. Comparative genomics of the medicinal plants *Lonicera macranthoides* and *L. japonica* provides insight into genus genome evolution and hederagenin-based saponin biosynthesis [J]. Plant Biotechnol J, 2023, 21(11): 2209-2223.

[37] 吴慧琴, 王延宏, 刘涵, 等. 辣椒*UGT*基因家族的鉴定及表达分析 [J]. 生物技术通报, 2024, 40(9): 198-211.
Wu HQ, Wang YH, Liu H, et al. Identification and expression analysis of *UGT* gene family in pepper [J]. Biotechnol Bull, 2024, 40(9): 198-211.

[38] 杨敏, 龙雨青, 曾娟, 等. 灰毡毛忍冬*UGTPg17*、*UGTPg36*基因克隆及功能研究 [J]. 生物技术通报, 2023, 39(10): 256-267.
Yang M, Long YQ, Zeng J, et al. Cloning and function analysis of gene *UGTPg17* and *UGTPg36* in *Lonicera macranthoides* [J]. Biotechnol Bull, 2023, 39(10): 256-267.

[39] Nakayama T, Takahashi S, Waki T. Formation of flavonoid metabolons: functional significance of protein-protein interactions and impact on flavonoid chemodiversity [J]. Front Plant Sci, 2019, 10: 821.

[40] Moore Pollard ER, Ellestad PA, Cliver BR, et al. Gene duplication dynamics and regulatory evolution shape the diversification of Asteraceae [J]. bioRxiv Prepr Serv Biol, 2025.

[41] Yang Q, Zhang YC, Qu XL, et al. Genome-wide analysis of UDP-glycosyltransferases family and identification of *UGT* genes involved in abiotic stress and flavonol biosynthesis in *Nicotiana tabacum* [J]. BMC Plant Biology, 2023, 23(1): 204.

[42] 彭朝凤, 夏琳, 刘瑞霞, 等. 基于VIGS和CRISPR/Cas9技术的烟草*NtPPO5*基因功能分析 [J]. 生物技术通报, 2026, 42(4): 251-262.
Peng CF, Xia L, Liu RX, et al. Functional analysis of the tobacco *NtPPO5* gene using VIGS and CRISPR/Cas9 technology [J]. Biotechnol Bull, 2026, 42(4): 251-262.

[43] Lovelock SL, Crawshaw R, Basler S, et al. The road to fully programmable protein catalysis [J]. Nature, 2022, 606(7912): 49-58.

（责任编辑　朱琳峰）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):274-282

宏基因组来源高比活7α-羟基类固醇脱氢酶结构和功能表征

刘雨婷[1] 肖恩乐[1] 龚雨霞[1] 唐湘华[1,2] 黄遵锡[1,2] 许波[1,2*]
（1.云南师范大学生命科学学院,昆明 650500; 2.云南特色生物资源高值化利用教育部工程研究中心,昆明 650500）

摘 要： 【目的】挖掘肠道微生物7α羟基类固醇脱氢酶（*7α-HSDH*）基因，异源表达、纯化并研究其酶学性质，为熊去氧胆酸（UDCA）的生物合成提供酶原。【方法】通过生物信息学分析，从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组中筛选*7α-HSDH*基因，经PCR扩增后克隆至pEASY-E2载体，在大肠杆菌BL21(DE3)中进行异源表达。重组酶经纯化和酶学性质表征，利用高效液相色谱法测定该酶催化鹅去氧胆酸（CDCA）生成UDCA的前体7-酮石胆酸（7K-LCA）的产量。【结果】获得未被表征的7α-HSDH NC3-2，该酶为四聚体，分子量为27.03 kD，辅酶与NAD(H)相关。NC3-2较其他微生物来源的7α-HSDH具有最高比活485.53 U/mg，最适作用条件为pH 10.0、50 ℃。该酶pH稳定性较好，pH 9.0-11.0条件下孵育12 h，保持60%以上剩余酶活；热稳定性有待提升，25、37、50、60 ℃下分别孵育12 h，剩余酶活保持在50%以上。EDTA可将其酶活性提高至128%；Triton X-100和Tween-80抑制作用较大，Ag^+与SDS使其完全失活。NC3-2催化CDCA反应8 h，7K-LCA浓度即可达到0.55 mg/mL。【结论】从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组中获得*7α-HSDH*基因*NC3-2*并成功实现异源表达。重组酶NC3-2具有较高的比活力与良好的耐碱性，在pH 10.0、30 ℃条件下可催化20 mmol/L CDCA生成7K-LCA，反应8 h时产物浓度趋于饱和。该酶在熊去氧胆酸的生物合成中具有应用潜力。

关键词： 宏基因组；熊去氧胆酸；7α-羟基类固醇脱氢酶；异源表达；酶学性质
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1466

A High-specific-activity 7α-hydroxysteroid Dehydrogenase from Metagenome: Structural and Functional Characterization

LIU Yu-ting[1] XIAO En-le[1] GONG Yu-xia[1] TANG Xiang-hua[1,2] HUANG Zun-xi[1,2] XU Bo[1,2*]
（1. *School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming* 650500; 2. *Ministry of Education Engineering Research Center for High-Value Utilization of Yunnan's Unique Biological Resources, Kunming* 650500）

Abstract: 【Objective】To explore the 7α-hydroxysteroid dehydrogenase (*7α-HSDH*) gene from the gut microbiota of *Nomascus concolor*, heterologously express and purify it, and study its enzymatic properties, so as to provide an enzyme for the biosynthesis of ursodeoxycholic acid. 【Method】Through bioinformatics analysis, the 7α-HSDH gene was screened from the fecal microbial metagenome of *Nomascus concolor*. After PCR amplification, it was cloned into the pEASY-E2 vector and heterologously expressed in *E. coli* BL21(DE3). The recombinant enzyme was purified and characterized. The yield of 7-ketolithocholic acid (7K-LCA), the precursor of UDCA, was determined by high-performance liquid chromatography. 【Result】A previously uncharacterized 7α-hydroxysteroid dehydrogenase, designated NC3-2, was obtained. The enzyme is a tetramer with a molecular weight of 27.03 kD and is NAD(H)-dependent. NC3-2 exhibited the highest specific activity (485.53 U/mg) among 7α-HSDHs from other microorganisms. The optimum pH was 10.0, and the optimum temperature was 50 ℃. NC3-2 showed good pH stability, retaining over 60% residual activity after 12 h of incubation at pH 9.0-11.0. The enzyme also exhibited good thermal stability, with more than 50% residual activity after 12 h at 25, 37, 50, and 60 ℃. Ag^+ completely inactivated NC3-2, while EDTA increased its activity to 128%. Triton X-100 and Tween-80 had strong inhibitory effects, and SDS completely inactivated the enzyme. The concentration of 7K-LCA reached 0.55 mg/mL

收稿日期：2025-12-31
基金项目：国家自然科学基金项目（32360034）
*通信作者：许波 xubo128028@163.com

after 8 h of catalysis by NC3-2.【Conclusion】A novel 7α-hydroxysteroid dehydrogenase gene, *NC3-2*, was obtained from the fecal microbial metagenome of *Nomascus concolor* and successfully heterologously expressed. The recombinant enzyme NC3-2 exhibits high specific activity and good alkali resistance. It can catalyze 20 mmol/L chenodeoxycholic acid (CDCA) to produce 7K-LCA, with an optimal reaction time of 8 h, demonstrating potential for application in the biosynthesis of ursodeoxycholic acid.

Keywords: metagenome; ursodeoxycholic acid; 7α-hydroxysteroid dehydrogenase; heterologous expression; enzymatic properties

肠道微生物群富含多种生化酶，不仅能够分解食物中的复杂成分，促进营养物质的吸收，还能催化合成胆汁酸。胆汁酸由胆固醇经肝脏生成，其中一部分经过肠肝循环回流肝脏，另一少部分胆汁酸流入肠道后与微生物发生交互，被微生物所代谢。这一过程调控脂质吸收、免疫平衡与肠道稳态，是影响宿主代谢健康的关键环节[1]。

近年研究发现，肠道微生物衍生的次级胆汁酸7-酮石胆酸（7-Keto lithocholic acid, 7K-LCA）和熊去氧胆酸（Ursodeoxycholic acid, UDCA）与宿主健康及疾病状态密切相关：7K-LCA是UDCA的合成前体，可通过增强肠道屏障功能与促进肠道干细胞的自我更新来促进肠道稳态[2]；UDCA则是自身免疫性胆道疾病的一线药物，具有抗胆汁抑制作用，并作为FXR受体激活剂，可促进肠道屏障修复、减少炎症因子表达，减轻代谢功能障碍相关脂肪肝炎的影响[3-4]。除此之外，UDCA可影响肠道微生物群，如调节*Ruminococcus*、*Blautia*和*Faecalibacteriu*等类群协同出现[5]。目前，生物合成法因其高效与经济性，已成为UDCA生产的重要途径。

在UDCA的生物合成中，起始关键酶7α-羟基类固醇脱氢酶（7α-hydroxysteroid dehydrogenase, 7α-HSDH, EC1.1.1.159）催化鹅去氧胆酸（Chenodeoxycholic acid, CDCA）的7α-羟基氧化生成7K-LCA，再由7β-HSDH（7β-hydroxysteroid dehydrogenase, 7β-HSDH）还原为UDCA（附图1）。7α-HSDH属于短链脱氢酶/还原酶家族，具有Rossmann折叠结构[6]，其活性受宿主与微生物相互作用调控，某些药物可通过改变肠道菌群或直接调节其活性来促进次级胆汁酸生成，从而干预相关疾病[7-8]。目前已从假单胞菌属（*Pseudomonas*）[9-10]、梭状芽胞杆菌属（*Clostridium*）[11-12]、真杆菌属（*Eubacterium*）[13-14]等多种微生物中发现，但普遍存在异源表达效率低的问题。由于该酶催化性能直接决定UDCA合成效率，开发高性能酶仍是研究重点。现有如定点突变[15]等酶工程手段受限于酶自身属性，因此从微生物资源中挖掘天然高活性、高稳定性的7α-HSDH是推动该领域发展的基础与关键。

动物胃肠道是丰富的微生物酶资源库，但绝大多数微生物难以通过传统方法培养，宏基因组学能克服此局限，可直接从环境中获取基因资源[16-17]。目前，虽已从黑熊肠道宏基因组中成功发掘出耐热*7α-HSDH*基因[18-19]，但酶的催化活性不足，且目前研究主要聚焦于酶稳定性的改造与工业应用，其他动物肠道中的7α-HSDH尚不清楚。西黑冠长臂猿是典型树栖灵长类，食性以芽、叶和果实等高纤维植物为主，偶尔摄食昆虫，并具有明显季节性波动[20]。为适应多样食源，西黑冠长臂猿的肠道微生物可能演化出丰富酶系，协助分解植物组织与蛋白质；同时灵长类动物消化高纤维食物需分泌大量胆汁酸，促进脂质乳化和吸收[21]。基于西黑冠长臂猿特殊的食性与肠道环境，其肠道微生物所携带的7α-HSDH可能在催化性能上更有特点，值得进一步探究。

为探究不同动物来源的7α-HSDH在酶活与稳定性方面的差异，挖掘性能更优的酶拓宽7α-HSDH的天然酶资源库，本研究从前期已得到的西黑冠长臂猿粪便宏基因组中筛选、扩增得到1个未被表征过的*7α-HSDH*基因（GeneBank：PX765971），并对其进行异源表达和酶学性质表征。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌种与质粒　载体pEASY-E2、西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组DNA，本实验室保藏；大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞，擎科生物（北京）公司。

1.1.2　主要试剂和仪器　限制性内切酶（*Nde* Ⅰ和*Xho* Ⅰ）和Prime STAR Max DNA Polymerase，TaKaRa公司；氨苄青霉素，北京索莱宝科技有限公司；质粒提取试剂盒和DNA胶回收纯化试剂盒，Omega公

司；鹅去氧胆酸（CDCA），上海源叶生物科技有限公司；Ni-NTA Agarose，Qiagen公司；NAD^+，上海麦克林生化科技股份有限公司。全波长酶标仪，赛默飞世尔科技公司；冷冻高速离心机，Eppendorf公司；PCR仪和蛋白胶电泳仪，Bio-Rad公司；超声波细胞粉碎机，宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 宏基因组数据库构建

（1）宏基因组测序分析。采用无菌取样采取西黑冠长臂猿新鲜粪便样品，分别为NC1（正常，2019.06.29）、NC2b（腹泻，2019.06.30）、NC3ysj（喂食乳酸菌素片，2019.07.11）。将采集的西黑冠长臂猿粪便样品送往上海美吉生物医药科技有限公司Illumina Miseq（Illumina Inc.，USA）进行测序。对原始序列（PE150，150 bp末端配对序列）进行质控，去除低质量的reads（测序接头序列、低质量碱基、不确定碱基信息的碱基及长度过短序列）。

（2）序列组装和基因预测。使用Megahit（http://github.com/voutcn/megahit）对高质量的reads序列进行多重混合拼接和组装；与Newbler（http://ngs.csr.uky.edu/Newbler）最大化利用测序数据，进行多重混合拼接组装，从而获得各样品的组装结果与conting长度分布。之后使用MetaGene（http://metagene.cb.k.u-tokyo.ac.jp）对拼接结果中的contings进行ORF预测，选择核酸长度>100 bp的基因，并将其翻译为氨基酸序列。使用CD-HIT软件（http://www.bioinformatics.org/cd-hit/）进行聚类，每个类取最长的基因作为代表序列构建非冗余基因集。

（3）KEGG-Enzyme功能注释。使用BLASTP将非冗余基因集序列与KEGG的基因数据库（GENES）进行比对（BLAST比对参数期望值E-value=1e-5），根据比对结果使用KOBAS2.0（KEGG Orthology Based Annotation System）进行功能注释。

（4）筛选目的基因。利用PilotEdit Lite软件，基于7α-HSDH的酶学编号（EC：1.1.1.159）对该数据库进行检索，进而从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组数据中获取该酶对应的核酸序列。随后，对查询结果进行分析，筛选具有完整开放阅读框（即包含完整起始密码子与终止密码子）的基因序列，将其作为后续克隆实验的候选对象。

1.2.2 基因克隆 从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组中共获得17条7α-羟基类固醇脱氢酶（*7α-HSDH*）基因序列。经序列分析，其中7条含有完整的开放阅读框（包含起始密码子及终止密码子）。进一步结合文献[15]已报道的7α-HSDH进行关键功能位点比对分析与基因克隆及异源表达，从上述7条序列中成功鉴定出1个具有完整功能结构域的*7α-HSDH*基因，命名为*NC3-2*。根据基因序列设计合成引物NC3-2 F（5′-TAAGAAGGAGATATACATATGGAATTGATGTCGATAGAATCGCTT-3′）与NC3-2 R（5′-GTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGGTCGAGTGTCTGCACTC-3′），以西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组DNA为模板，进行PCR扩增。PCR反应体系为：DNA模板（1 μmol/L）1.0 μL，引物NC3-2 F与NC3-2 R（10 μmol/L）各0.4 μL，Prime STAR Max DNA Polymerase 5 μL，无菌双蒸水补足至总体积10 μL。PCR反应程序见附表1。

扩增结束后，使用DNA胶回收纯化试剂盒回收目的基因片段，并将其与经双酶切的质粒pEASY-E2进行连接。连接产物转化至感受态大肠杆菌BL21(DE3)中，获得重组菌株*E. coli*/NC3-2。随后通过菌液PCR对阳性克隆进行验证，确认无误后保存菌种并送测序。

1.2.3 7α-HSDH序列的系统进化分析 使用Snapgene预测蛋白质的理论分子量大小；使用NCBI（https://static.pubmed.gov/portal/portal.fcgi/）获取不同来源的7α-HSDH；使用在线网站Clustalw（https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw）进行多序列比对分析；采用在线网站ESPript 3.0对其进行美化；使用软件MEGA 11.0中neighbor-joining（NJ）方法构建系统发育树。

1.2.4 7α-HSDH NC3-2结构预测 使用SWISS-MODEL在线工具进行同源建模。建模完成后将PDB文件导入Pymol进行修饰，之后使用Autodock进行分子对接，得到NC3-2的蛋白结构以及与底物和辅酶的结合位点。

1.2.5 蛋白的表达与纯化 将菌株*E.coli*/NC3-2按0.1%接种量接入5 mL含氨苄青霉素（ampicillin, Amp, 100 mg/L）的LB培养基中，于37 ℃、180 r/min振荡培养过夜。之后以1%的接种量转接至500 mL

含相同浓度Amp的LB培养基中，在37 ℃下扩大培养3–4 h，待OD_{600}达到0.6–0.8后加入终浓度为0.2 mmol/L的IPTG，于16 ℃、110 r/min诱导表达12 h。诱导后的菌体经150 W功率超声破碎5 min，离心去除细胞碎片后获得粗酶液。该粗酶液进一步通过Ni-NTA Agarose进行纯化，最终得到纯酶NC3-2，并利用SDS-PAGE与Native-PAGE对其进行蛋白分析。

1.2.6　7α-羟基类固醇脱氢酶活测定　酶活性测定参照柳志永等[15]的方法，略有改动。酶活体系共400 μL：310 μL Tris-HCl缓冲液（pH 10.0），30 μL CDCA，30 μL NAD^+，30 μL纯酶。将310 μL Tris-HCl缓冲液（pH 10.0）、30 μL CDCA及30 μL NAD^+混合，37 ℃预热10 min，加入30 μL稀释适当倍数的酶，反应2 min后，沸水煮沸5 min终止反应。离心后取200 μL上清液至酶标板，使用酶标仪读取340 nm波长下的OD值。将上述30 μL酶换为30 μL缓冲液作为空白对照。在每组反应体系中设置1个空白对照组，同时设置3个平行实验组，并确保每组反应条件完全一致。根据NADH标准曲线计算得出7α-HSDH酶活。酶活单位定义为：一个酶活单位（U）即每mol NAD^+被还原为NADH所需的酶量。

1.2.7　酶学性质测定

（1）最适温度和温度稳定性测定。为了确定酶的最适反应温度，在0–80 ℃范围内（梯度设置为0、10、20、30、40、45、50、55、60、70、80 ℃）测定酶活性。以最高活性值为100%，根据各温度下测得的吸光值计算相对活性，最高活性对应的温度即为酶的最适作用温度。

为进一步确定酶的热稳定性，将酶液分别在25、37、50、60 ℃下孵育0–72 h，随后在50 ℃、pH 10.0的条件下测定其剩余酶活性。以未经过热处理的酶液作为对照（在最适反应条件下测定其活性为100%），通过比较计算不同温度和时间处理后的相对活性，进而分析酶的热稳定性。

（2）最适pH和pH稳定性测定。为测定酶的最适pH，分别在pH 5.0–12.0范围内进行酶活力测定。参照最适温度的判定方法，将最高酶活力设为100%，计算各pH条件下的相对活力，从而确定酶的最适pH。缓冲液体系：pH 5.0–6.0柠檬酸-Na_2HPO_4缓冲液，pH 7.0–8.0 Tris-HCl缓冲液，pH 9.0–12.0甘氨酸-NaOH缓冲液。

为进一步确定酶的pH稳定性，将酶液置于pH 9.0–11.0的缓冲液中，于50 ℃下分别孵育2、4、6、8、10及12 h。随后在最适反应条件下测定各处理组的剩余酶活性。以未经缓冲液孵育的酶液作为对照，通过比较剩余活性与对照活性的差异，分析酶在不同pH环境下的稳定性。

（3）底物特异性测定。在酶最适反应条件下，以鹅去氧胆酸（CDCA）、甘氨鹅去氧胆酸（glycochenodeoxycholic cacid, GCDCA）、牛磺鹅去氧胆酸（taurochenodeoxycholic acid, TCDCA）、脱氧胆酸（deoxycholic acid, DCA）为底物进行底物特异性活力测定。

（4）动力学参数测定。通过梯度稀释配置CDCA底物溶液（浓度范围0–26 mmol/L），在最适反应条件下进行酶活测定。使用GraphPad Prism 9.5对NC3-2酶催化CDCA与CA反应的动力学参数进行定量分析，确定其米氏常数（K_m）与最大反应速率（V_{max}）。

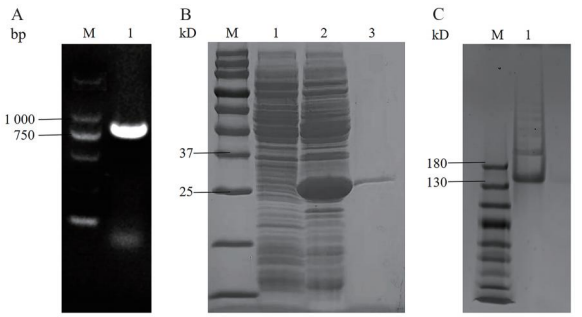
（5）金属离子和化学试剂影响测定。在反应体系中加入终浓度1.25 mmol/L的金属离子（K^+、Li^+、Na^+、Ag^+、Ca^{2+}、Cu^{2+}、Zn^{2+}、Co^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}、Mg^{2+}、Fe^{2+}、Al^{3+}、Fe^{3+}）和1%的化学试剂（SDS、EDTA、Tween-80）。测定最适反应条件下重组酶在各体系中的酶活力，未加金属离子和化学试剂的酶活力设为100%。其中为避免缓冲液干扰，检测Na^+时将原缓冲液替换为Tris-HCl缓冲液。

1.2.8　7α-羟基类固醇脱氢酶产量测定　参照文献[22]的方法，采用高效液相色谱（HPLC）测定产物7-酮石胆酸（7K-LCA）的产量。反应体系（10 mL）包含Tris-HCl缓冲液（pH 10.0）、20 mmol/L NAD^+、20 mmol/L鹅脱氧胆酸（CDCA）以及纯化后的酶蛋白。反应在30 ℃、200 r/min条件下进行12 h，期间每隔2 h取样1次。反应结束后，将反应液置于沸水浴中处理10 min以终止反应，随后离心取上清。上清液经pH调节至3.0后再次离心，收集沉淀并用色谱级甲醇洗涤。采用C_{18}色谱柱，以60%乙腈为流动相，在195 nm波长下检测紫外吸收。通过与溶于甲醇的7K-LCA标准品对比，计算得到7K-LCA的产量。

2 结果

2.1 7α-羟基类固醇脱氢酶的克隆、序列分析及异源表达

从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组中成功筛选并克隆出7α-羟基类固醇脱氢酶基因*NC3-2*。*NC3-2*基因全长777 bp，GC含量为54.83%。通过核酸电泳分析证实，*NC3-2*基因的片段长度与预期值相符（图1-A）。经纯化和SDS-PAGE检测得到分子量在25–37 kD间的单一条带（图1-B），约27.03 kD，与理论值相近。Native-PAGE显示目的条带介于130–180 kD（图1-C），与7α-HSDH同源四聚体理论值（108 kD）受形状、电荷等影响后的表观行为一致，证实其正确组装为四聚体且有生理活性。



A：M：DNA marker；1：*NC3-2*；B：M：蛋白分子量标准；1：含空载质粒pEASY-E_2的大肠杆菌细胞裂解液；2：未纯化7α-HSDH NC3-2；3：7α-HSDH NC3-2纯酶；C：M：蛋白分子量标准；1：NC3-2纯酶

A: M: DNA marker; 1: *NC3-2*; B: M: Protein molecular weight standard; 1: *Escherichia coli* cell lysate containing empty plasmid pEASY-E_2; 2: Unpurified 7α- HSDH NC3-2; 3: purified 7α-HSDH NC3-2; C: M: Protein molecular weight standard; 1: purified NC3-2

图1 NC3-2的PCR克隆(A)、SDS-PAGE分析(B)与Native-PAGE分析(C)

Fig. 1 PCR cloning of NC3-2 (A), SDS-PAGE analysis (B), and Native-PAGE analysis (C)

将NC3-2的氨基酸序列与不同来源的7α-羟基类固醇脱氢酶氨基酸序列进行比对分析。多序列比对结果显示（附图2），不同来源的7α-羟基类固醇脱氢酶氨基酸序列存在多个保守区域，催化三联体为Ser146-Tyr159-Lys163，底物结合位点为Gly100、Asn151、Ser154。辅酶识别氨基酸为酸性氨基酸–天冬氨酸，故NC3-2以NAD^+为辅酶。

根据系统进化分析（图2），NC3-2的氨基酸序列与卟啉单胞菌科（Porphyromonadaceae）来源的7α-羟基类固醇脱氢酶相似性最高，与*Stenotrophomonas pictorum*、*Psychrobacter* sp.聚为一支。结构预测（图3）及Native-PAGE结果（图1-C）显示，NC3-2以4个相同单体构成四聚体，其底物与辅酶结合位点位于结构的中心区域，辅酶与Val 246结合。

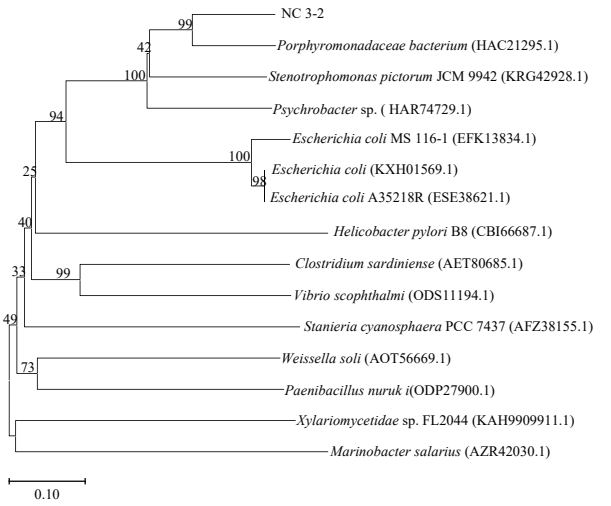
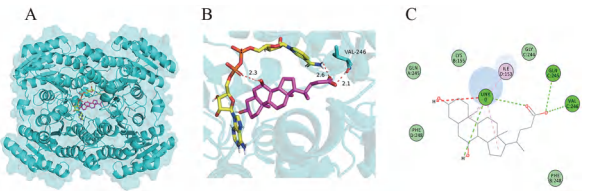


图2 NC3-2与不同微生物来源的7α-羟基类固醇脱氢酶的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of NC3-2 and other 7α-hydroxysteroid dehydrogenases from different microorganisms



A：复合物整体结构；B：结合口袋相互作用(3D)；C：结合作用力图(2D)，其中：浅绿色为范德华力，深绿色为氢键，红色为供体，粉色为烷基

A: The overall structure of the complex; B: binding pocket interaction (3D); C: 2D binding interaction diagram, where light green is van der Waals force, dark green is hydrogen bond, red is donor, and pink indicates alkyl interactions

图3 NC3-2的同源四聚体三维结构模型及结合作用力可视化

Fig. 3 Three-dimensional structure model of homotetramer of NC3-2 and visualization of binding interactions

2.2 7α-羟基类固醇脱氢酶NC3-2的比活值及酶学性质分析

2.2.1 7α-羟基类固醇脱氢酶NC3-2比活值 根据不

同浓度梯度测得辅酶NADH标准曲线计算得到7α-羟基类固醇脱氢酶NC3-2比活值可达485.53 U/mg。

2.2.2　最适温度和温度稳定性　在不同温度下检测NC3-2酶活的结果如图4-A所示，7α-羟基类固醇脱氢酶NC3-2的最适温度为50 ℃。NC3-2在30–60 ℃时，活性均高于50%，其他温度酶活性均低于50%。酶NC3-2的温度稳定性结果如图4-B所示，在25 ℃和37 ℃下孵育72 h后，剩余酶活分别为90%和68%；在50 ℃孵育72 h后降至40%；60 ℃孵育48 h则完全失活。

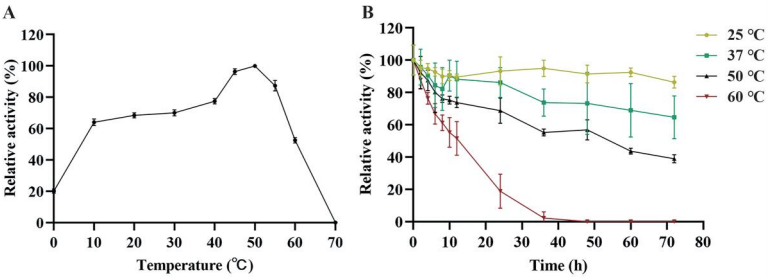


图4　7α-羟基类固醇脱氢酶NC3-2的最适温度(A)和温度稳定性(B)

Fig. 4　Optimal temperature (A) and temperature stability (B) of 7α-HSDH NC3-2

2.2.3　最适pH和pH稳定性　在不同pH下检测7α-羟基类固醇脱氢酶NC3-2酶活的结果如图5-A所示，7α-羟基类固醇脱氢酶NC3-2的最适pH为10。NC3-2在pH 7.0–11.0范围内，活性均高于60%，其他pH条件下酶活性均低于60%。7α-羟基类固醇脱氢酶NC3-2的pH稳定性结果如图5-B所示，7α-羟基类固醇脱氢酶NC3-2在pH 9.0–11.0处理12 h后剩余酶活高于60%，在pH 9.0–10.0条件下处理12 h后酶活性仍高于90%，表现出较好的碱稳定性。

2.2.4　底物特异性及动力学参数测定　酶活性分析表明，重组酶NC3-2对多种底物表现出水解活性，但其催化效率存在差异。该酶对鹅脱氧胆酸（CDCA）、牛磺鹅脱氧胆酸（TCDCA）、甘氨鹅脱氧胆酸（GCDCA）和胆酸（CA）均有活性，但对脱氧胆酸（DCA）无活性。在以CDCA的活性为参照（100%）时，其对TCDCA、GCDCA和CA的相对活性分别为（107.24 ± 4.34）%、（105.3 ± 7.47）%和（212.38 ± 17.15）%，其中对CA的活性显著高于其他底物。进一步的动力学研究表明，以CDCA为底物时，该酶的K_m值为（32.42 ± 5.35）mmol/L，V_{max}为（1021 ± 107.87）U/mg；以CA为底物时，该酶的K_m值为（11.75 ± 0.38）mmol/L，V_{max}为（2561 ± 39.9）U/mg。

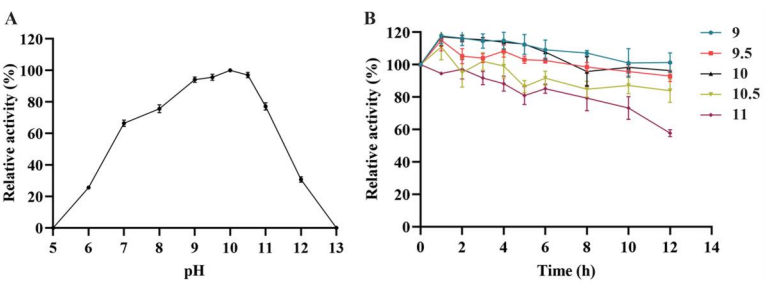


图5　7α-羟基类固醇脱氢酶NC3-2的最适pH(A)和pH稳定性(B)

Fig. 5　Optimal pH (A) and pH stability (B) of 7α-HSDH NC3-2

2.2.5　金属离子和化学试剂影响　由表1可知，在1.25 mmol/L Ag^+的影响下，活性完全被抑制，其余金属离子对该酶的影响不大；化学试剂EDTA对NC3-2的相对酶活性有促进作用，可将其酶活性提高至128%，Tritan-10、Tween-80对酶活的抑制作用较大，而SDS可使NC3-2酶完全失活。

表1 金属离子和化学试剂对7α-羟基类固醇脱氢酶NC3-2的影响

Table 1 Effects of metal ions and chemical reagents on 7α-HSDH NC3-2

Metal ions and chemical reagents		Relative activity (%)
Metal ions (1.25 mmol/L)	Control	100 ± 4.97
	Co^{2+}	108.58 ± 7.13
	Cu^{2+}	105.59 ± 13.03
	Ag^{+}	0.00
	Mn^{2+}	84.62 ± 8.01
	K^{+}	95.03 ± 9.54
	Al^{3+}	82.66 ± 9.96
	Ni^{+}	97.43 ± 4.86
	Zn^{2+}	92.38 ± 4.70
	Li^{+}	91.49 ± 5.36
	Mg^{2+}	94.46 ± 2.18
	Na^{+}	97.08 ± 3.10
	Ca^{2+}	86.64 ± 7.02
Chemical reagents (1%, v/v)	Acetone	90.26 ± 9.35
	EDTA	128.72 ± 10.49
	Tween-80	44.93 ± 4.54
	SDS	0.00
	DTT	94.72 ± 4.71
	TritonX-100	7.11 ±1.83

2.3 7-酮石胆酸的产量

测量不同时间内NC3-2转化CDCA生成7K-LCA的产量。由图6可知，在反应2 h后7K-LCA的浓度达到0.43 mg/mL，之后缓慢增多，8 h后达到0.55 mg/mL，后续7K-LCA的浓度变化幅度较小，显著性分析显示8 h后产物浓度无显著性变化（P>0.05），反应达到饱和，因此在实际生产过程中，最适宜的生产时间为8 h。

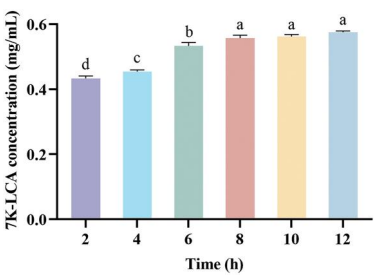


图6 7K-LCA产量

Fig. 6 Yield of 7K-LCA

3 讨论

7α-羟基类固醇脱氢酶在肠道菌群与宿主互作中扮演重要角色，其活性可通过调节次级胆汁酸的生成影响相关疾病进程。本研究基于西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组，筛选并异源表达了来源于Porphyromonadacea的7α-羟基类固醇脱氢酶基因*NC3-2*。该科属于拟杆菌门，可通过产生乙酸盐和丙酸盐等短链脂肪酸参与宿主代谢调节[23]。研究显示，在胆管癌等疾病状态下，肠道内Porphyromonadaceae的丰度显著下降[24]，而UDCA已被证实对肝内胆管癌具有潜在治疗作用[25]，因此推测，Porphyromonadaceae丰度下降可能导致肠道内7α-HSDH活性降低，进而减少UDCA的肠源性合成，破坏胆汁酸池组成平衡。这一变化可能削弱UDCA对胆管上皮细胞的保护作用，从而影响胆管癌的发生或发展进程。

多序列比对显示7α-HSDH存在多个保守区域，而NC3-2完整保留了SDR家族经典的催化三联体（Ser146-Tyr159-Lys163）与关键底物结合残基（Gly100、Asn151、Ser154），表明其具备典型的催化结构基础。根据Kim等[26]的研究，在催化机制上，Tyr159作为催化碱夺取底物7α-羟基的质子，启动氢负离子转移；Lys163的ε-氨基通过氢键连接辅酶磷酸基团与Tyr159羟基，稳定过渡态并降低反应活化能；Ser146则协助稳定活性中心结构，并可能参与底物结合或质子转移网络。

在酶催化反应的成本控制中，辅酶的选择是重要考量因素。与$NADP^{+}$相比，NAD^{+}的市场价格更低、供应稳定，因此在规模化应用中具有明显的经济优势。本研究中的酶NC3-2，与来自大肠杆菌（*Escherichia coli*）和脆弱拟杆菌（*Bacteroides fragilis*）的7α-HSDH均特异性地依赖于NAD^{+}作为辅酶（附表2）。7α-HSDH与辅酶的结合特异性由其第2个β折叠末端的氨基酸残基决定[6]。序列分析显示，NC3-2在该位点是一个酸性的天冬氨酸残基，其所产生的空间排斥效应，能有效阻碍带有额外2′-磷酸基团的$NADP^{+}$的结合。这种对NAD^{+}的专一性选择，使NC3-2更倾向于催化氧化反应，从而高效地将7α-羟基氧化为7-酮基，生成目标产物7K-LCA。

从微生物资源中挖掘具有天然高活性与高稳定性的7α-HSDH，是目前需要解决的重要问题。本研究异源表达的NC3-2，其最高比活达485.53 U/mg，是此前报道的最高酶活（来自*Brevundimonas* sp.的

7α-HSDH）的1.03倍[27]且高于目前发现的绝大多数7α-HSDH（附表2）。7α-羟基类固醇脱氢酶大多为碱性和中温酶，即最适作用pH在8.5–10.5、最适作用温度在40–65 ℃的范围。本研究中的NC3-2最适温度为50 ℃，但在50 ℃处理36 h后仅保留约60%活性，与其他来源的7α-HSDH相比，来自黑熊肠道宏基因组的J-1-1在30 ℃和40 ℃下热处理100 h后活性仍分别保持78%和73%[28]。同样来自黑熊肠道的Sa 7α-HSDH在50 ℃下处理32 h后仍能维持90%以上的活性[18]。尽管目前工业应用中尚未对反应温度与时间形成统一标准，但现有研究多在20–50 ℃范围内进行UDCA生物合成的研究[29–30]。综合以上结果，该酶在长期热应激条件下的结构稳定性仍有待提升；最适pH为10.0，在pH 10.0的条件下孵育12 h后仍能保持90%以上的残余酶活，显示出良好的碱耐受性。这一特性为其与7β-HSDH在相近碱性条件下的协同催化应用提供了重要基础。

研究表明，NC3-2对金属离子和化学试剂不敏感，大多数金属离子对该酶有轻微的抑制作用，这与黑熊来源的Sa 7α-HSDH与St-2-1的研究相反[18–19]，推测是由于活性中心的氨基酸有差异导致。Ag^{+}和SDS可使酶完全失活，EDTA则显著增强其酶活，推测这些试剂均通过影响酶构象来调控其活性。底物特异性分析表明，NC3-2在底物特异性方面也表现出较好的广泛性，不仅能够水解CDCA，对胆酸及其衍生物也具有一定的水解能力，该特性与来自*Escherichia coli*[31]和*Clostridium difficile*[32]的7α-HSDH结果一致。较宽的底物特异性虽有助于酶适应多样化的环境，但也可能导致非选择性催化，进而形成在天然熊胆汁中不存在的副产物，可能最终影响产品的真实性与安全性[33]。

在实际生产中，精准控制反应时间是实现高效酶催化过程的关键，确定适宜的反应时长对于优化酶的使用效率和降低生产成本具有重要意义。本研究中，NC3-2催化该氧化还原反应进行至2 h后产物生成速率逐渐放缓，至8 h后产物积累基本趋于稳定，产量变化幅度显著减小，表明反应已接近平衡状态。因此，从生产效率与能耗控制两方面综合评估，该酶在实际催化过程中的最佳反应时间为8 h。

当前，7α-HSDH在工业应用中多与7β-HSDH联合使用，主要采用一锅两步法或全细胞催化系统进行连续催化转化[34]。为进一步提升整体合成效率，未来可着力筛选与NC3-2酶特性相近或催化性能更优的7β-HSDH，构建更高效的双酶偶联体系，从而推动其在规模化生产中的应用潜力。

4　结论

从西黑冠长臂猿粪便微生物宏基因组中筛选获得了一个新型7α-羟基类固醇脱氢酶基因*NC3-2*。该酶的比活力可达485.53 U/mg，在pH 9.0–10.0条件下孵育12 h后，NC3-2的剩余酶活仍保持在90%以上，展现出优异的耐碱性。该新型酶的发掘丰富了天然7α-HSDH的酶资源库，为熊去氧胆酸的生物合成提供了一种性能优良的候选酶。

文章所有附图附表请点击链接查看（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260520162635_NewsFile_31.pdf）

参考文献

[1] Tyagi A, Kumar V. The gut microbiota-bile acid axis: a crucial regulator of immune function and metabolic health [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2025, 41(7): 215.

[2] Li T, Ding N, Guo HQ, et al. A gut microbiota-bile acid axis promotes intestinal homeostasis upon aspirin-mediated damage [J]. Cell Host Microbe, 2024, 32(2): 191-208.e9.

[3] Bai X, Duan ZG, Deng JJ, et al. Ginsenoside Rh4 inhibits colorectal cancer via the modulation of gut microbiota-mediated bile acid metabolism [J]. J Adv Res, 2025, 72: 37-52.

[4] Henry ZR, Maliha S, Basaly V, et al. Ursodeoxycholic acid acts as an ileal FXR agonist in male mice with hepatic deficiency of FXR [J]. eGastroenterology, 2025, 3(3): e100227.

[5] Pearson T, Caporaso JG, Yellowhair M, et al. Effects of ursodeoxycholic acid on the gut microbiome and colorectal adenoma development [J]. Cancer Med, 2019, 8(2): 617-628.

[6] Lou DS, Liu X, Tan J. An overview of 7α- and 7β-hydroxysteroid dehydrogenases: structure, specificity and practical application [J]. Protein Pept Lett, 2021, 28(11): 1206-1219.

[7] Thibaut MM, Roumain M, Piron E, et al. The microbiota-derived bile acid taurodeoxycholic acid improves hepatic cholesterol levels in mice with cancer *Cachexia* [J]. Gut Microbes, 2025, 17: 2449586.

[8] Shi ZH, Wang BY, Wang SQ, et al. Dynamic regulation of gut microbiota in high-fat or normal-fed mice by dietary phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine [J]. Food Biosci, 2025, 71: 107314.

[9] Ueda S, Od M, Imamura S, et al. Molecular and enzymatic properties of 7α-hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. B-0831 [J]. Int J Biol Macromol, 2004, 4(1): 33-38.

[10] Pedrini P, Andreotti E, Guerrini A, et al. Xanthomonas maltophilia CBS 897.97 as a source of new 7β- and 7α-hydroxysteroid dehydrogenases and cholylglycine hydrolase: Improved biotransformations of bile acids [J]. Steroids, 2006, 71(3): 189-198.

[11] Coleman JP, Hudson LL, Adams MJ. Characterization and regulation of the NADP-linked 7 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene from *Clostridium sordellii* [J]. J Bacteriol, 1994, 176(16): 4865-4874.

[12] Ji W, Chen YA, Zhang H, et al. Cloning, expression and characterization of a putative 7alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in *Comamonas testosteroni* [J]. Microbiol Res, 2014, 169(2/3): 148-154.

[13] Franklund CV, de Prada P, Hylemon PB. Purification and characterization of a microbial, NADP-dependent bile acid 7 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase [J]. J Biol Chem, 1990, 265 (17): 9842-9849.

[14] Baron SF, Franklund CV, Hylemon PB. Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for bile acid 7 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from *Eubacterium* sp. strain VPI 12708 [J]. J Bacteriol, 1991, 173(15): 4558-4569.

[15] 柳志永, 张荣珍, 徐岩. Met196突变提高*Brucella melitensis* 7α-羟基类固醇脱氢酶的催化效率和稳定性 [J]. 微生物学报, 2022, 62(5): 1769-1783.
Liu ZY, Zhang RZ, Xu Y. Met196 mutation improves catalytic efficiency and stability of *Brucella melitensis* 7α-hydroxysteroid dehydrogenase [J]. Acta Microbiol Sin, 2022, 62(5): 1769-1783.

[16] 许波, 杨富亚, 慕跃林, 等. 胃肠道微生物及其分子生态学技术研究进展 [J]. 微生物学通报, 2014, 41(1): 136-145.
Xu B, Yang FY, Mu YL, et al. Molecular ecology applied to gastrointestinal tract microorganisms [J]. Microbiol China, 2014, 41 (1): 136-145.

[17] Wang WL, Xu SY, Ren ZG, et al. Application of metagenomics in the human gut microbiome [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(3): 803.

[18] Lou DS, Cao YY, Duan HT, et al. Characterization of a novel thermostable 7α-hydroxysteroid dehydrogenase [J]. Protein Pept Lett, 2024, 31(2): 153-160.

[19] Tang SJ, Pan YP, Lou DS, et al. Structural and functional characterization of a novel acidophilic 7α-hydroxysteroid dehydrogenase [J]. Protein Sci, 2019, 28(5): 910-919.

[20] Fan PF, Ni QY, Sun GZ, et al. Gibbons under seasonal stress: the diet of the black crested gibbon (*Nomascus concolor*) on Mt. Wuliang, Central Yunnan, China [J]. Primates, 2009, 50(1): 37-44.

[21] Li XY, Wang XC, Wang ZM, et al. The relationship between gut microbiome and bile acids in Primates with diverse diets [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 899102.

[22] Liu ZY, Zhang RZ, Zhang WC, et al. Ile258Met mutation of *Brucella melitensis* 7α-hydroxysteroid dehydrogenase significantly enhances catalytic efficiency, cofactor affinity, and thermostability [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2021, 105(9): 3573-3586.

[23] Lu YY, Fan CN, Li P, et al. Short chain fatty acids prevent high-fat-diet-induced obesity in mice by regulating G protein-coupled receptors and gut microbiota [J]. Sci Rep, 2016, 6: 37589.

[24] Avilés-Jiménez F, Yu GQ, Torres-Poveda K, et al. On the search to elucidate the role of microbiota in the genesis of cancer: the cases of gastrointestinal and cervical cancer [J]. Arch Med Res, 2017, 48 (8): 754-765.

[25] Liu SS, Liang ZX, Zhu LS, et al. FXR-mediated antigen-specific $CD8^{+}$T cell enhances antitumor immunity in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. J Immunother Cancer, 2025, 13(11): e012259.

[26] Kim KH, Lee CW, Pardhe BD, et al. Crystal structure of an apo 7α-hydroxysteroid dehydrogenase reveals key structural changes induced by substrate and co-factor binding [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2021, 212: 105945.

[27] Chen X, Cui YF, Feng JH, et al. Flavin oxidoreductase-mediated regeneration of nicotinamide adenine dinucleotide with dioxygen and catalytic amount of flavin mononucleotide for one-pot multi-enzymatic preparation of ursodeoxycholic acid [J]. Adv Synth Catal, 2019, 361(11): 2497-2504.

[28] Ji SL, Pan YP, Zhu LC, et al. A novel 7α-hydroxysteroid dehydrogenase: Magnesium ion significantly enhances its activity and thermostability [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 177: 111-118.

[29] Xu YP, Yang L, Zhao SJ, et al. Large-scale production of tauroursodeoxycholic acid products through fermentation optimization of engineered *Escherichia coli* cell factory [J]. Microb Cell Fact, 2019, 18: 34.

[30] Zhang X, Xin JG, Liu MY, et al. Cost-effective whole-cell biosynthesis of ursodeoxycholic acid using engineered *Escherichia coli* with a multienzyme cascade [J]. Front Microbiol, 2025, 16: 1538237.

[31] Yoshimoto T, Higashi H, Kanatani A, et al. Cloning and sequencing of the 7 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene from *Escherichia coli* HB101 and characterization of the expressed enzyme [J]. J Bacteriol, 1991, 173(7): 2173-2179.

[32] Bakonyi D, Hummel W. Cloning, expression, and biochemical characterization of a novel $NADP^{+}$-dependent 7α-hydroxysteroid dehydrogenase from *Clostridium difficile* and its application for the oxidation of bile acids [J]. Enzyme Microb Technol, 2017, 99: 16-24.

[33] Jin LN, Chen M, Yang L, et al. Structure-guided single-point mutagenesis and carboxyl-terminal truncation improved the substrate selectivity of 7α-hydroxysteroid dehydrogenase [J]. Int J Biol Macromol, 2025, 328: 147545.

[34] Song P, Zhang X, Feng W, et al. Biological synthesis of ursodeoxycholic acid [J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1140662.

（责任编辑 张婷婷）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):283-296

基于代谢组学解析白酒糟双菌发酵单细胞蛋白的原料品质

桂元[1#] 杨婷妃[1#] 王风青[1] 刘军[2] 刘根侨[1] 李仲玄[1] 廖钰婷[1]
王川[1] 李丽[1*] 周正富[3*]

（1.四川轻化工大学食品与酿酒工程学院，宜宾 644005；2.四川丰酵生物科技有限公司，宜宾 644005；3.中国农业科学院生物技术研究所，北京 100081）

摘 要： 【目的】研究产朊假丝酵母与酿酒酵母双菌固态发酵白酒糟制备单细胞蛋白（single-cell protein, SCP）的工艺条件，基于代谢组学分析发酵产物的代谢物谱变化，及其与蛋白品质、风味特性、安全性的关联。【方法】以浓香型白酒糟为底物，采用单因素与Box-Behnken试验设计优化发酵工艺，利用代谢组学分析双菌发酵与空白原料中挥发性及非挥发性代谢物差异，并结合营养成分测定、体外消化试验及霉菌毒素检测进行系统品质评价。【结果】最优发酵工艺为麸皮15%、温度30 ℃、接种量15%、水分58%、pH 5.5和发酵时间3 d，发酵后酸溶蛋白（acid-soluble protein, ASP）明显提升35.03%，粗蛋白（crude protein, CP）和真蛋白（true protein, TP）分别提升16.64%、29.32%。代谢组学共鉴定出9类92种挥发性风味物质，其中酯类含量大幅增加，已醛等不良风味物质显著下降；差异代谢物共筛选出296个，其中脂类及萜类衍生物显著上调，芳香族等氨基酸类及蒽醌类显著下调；KEGG富集显示谷氨酸等氨基酸生物合成、2-氧代羧酸代谢等4条通路被激活。体外消化率显著提升，霉菌毒素未检出，符合国标饲料卫生标准。【结论】产朊假丝酵母与酿酒酵母双菌固态发酵白酒糟的工艺能显著改善蛋白品质与风味特性，为白酒糟高值化利用提供了基于代谢组学的数据支撑与品质评价新视角。

关键词： 白酒糟；单细胞蛋白；双菌协同发酵；代谢组学；品质评价

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0567

Raw Material Quality Analysis of Single-cell Protein Production from Baijiu Distiller's Grains via Dual-strain Fermentation Based on Metabolomics

GUI Yuan[1#] YANG Ting-fei[1#] WANG Feng-qing[1] LIU Jun[2] LIU Gen-qiao[1] LI Zhong-xuan[1] LIAO Yu-ting[1]
WANG Chuan[1] LI Li[1*] ZHOU Zheng-fu[3*]

(1. *School of Food and Liquor Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Yibin* 644005; 2. *Sichuan Fengjiao Biotechnology Co., Ltd., Yibin* 644005; 3. *Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing* 100081)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to investigate the process conditions for producing single-cell protein (SCP) from Baijiu distiller's grains through solid-state fermentation with *Candida utilis* and *Saccharomyces cerevisiae*, and to analyze the changes in metabolite profiles of the fermented products based on metabolomics, as well as their associations with protein quality, flavor characteristics, and safety. 【Method】 Nongxiang-type Baijiu distiller's grain served as the substrate. Single-factor and Box-Behnken experimental designs were used to optimize the fermentation process. Metabolomics analysis identified differences in volatile and non-volatile metabolites between dual-strain

收稿日期：2026-05-19
基金项目：国家重点研发计划项目（2024YFD1200205），中国农业科学院重大科技任务（CAAS-ZDRW202609），泸州老窖产学研合作项目（2026HX19）
*通信作者：李丽 li_li821008@163.com，周正富 zhouzhengfu@caas.cn
#同等贡献

fermented samples and the blank control. Nutrient composition determination, *in vitro* digestion tests, and mycotoxin detection were performed to complete the systematic quality evaluation. 【Result】 The optimal fermentation parameters were determined as 15% wheat bran supplementation, 30 ℃, 15% inoculum size, 58% moisture content, pH 5.5, and 3-day fermentation duration. After fermentation, acid-soluble protein (ASP) increased markedly by 35.03%, while crude protein (CP) and true protein (TP) increased by 16.64% and 29.32%, respectively. Metabolomics analysis identified 92 volatile flavor compounds across 9 chemical classes. Ester contents increased substantially, while undesirable flavor substances such as hexanal decreased significantly. A total of 296 differential metabolites were screened, among which lipids and terpenoid derivatives were significantly up-regulated, while aromatic amino acids and anthraquinones were significantly down-regulated. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis revealed the activation of four metabolic pathways, including glutamic acid biosynthesis and 2-oxocarboxylic acid metabolism. *In vitro* digestibility improved significantly, mycotoxin tests showed negative results, and the product met national feed hygiene standards. 【Conclusion】 The solid-state fermentation of liquor residue using both *Candida utilis* and *Saccharomyces cerevisiae* can significantly improves protein quality and flavor characteristics, and providing metabolomics-based data support and a novel quality evaluation perspective for the high-value utilization of Baijiu distiller's grains.

Keywords: Baijiu distiller's grains; single-cell protein; dual-bacteria synergistic fermentation; metabolomics; quality evaluation

在全球蛋白资源短缺与“双碳”政策驱动下，单细胞蛋白（single-cell protein, SCP）作为新型非粮蛋白源，是缓解饲料蛋白进口依赖的重要替代方案[1-2]。我国白酒糟年产量超1 000万t，虽富含粗蛋白与残余淀粉，但高水分、高酸度特性使其极易腐败，处置不当将严重威胁生态环境[3]。将白酒糟转化为SCP原料，既可实现固体废弃物无害化处理与资源化利用，为饲料工业提供可持续蛋白来源，又能推动白酒产业循环经济与绿色低碳发展，对保障国家饲料粮安全、落实“双碳”战略具有重要的农业生产价值与生态意义。

近年来，利用酵母固态发酵提升白酒糟蛋白品质的研究已取得一定进展。在菌种组合方面，从单一菌种发酵逐步发展到多菌种组合发酵。已有研究采用绿色木霉、干酪乳杆菌、枯草芽胞杆菌和黑曲霉混合发酵白酒糟后蛋白含量达33.32%[4]；也有研究通过筛选最优微生物组合，发现唾液乳杆菌、酿酒酵母与枯草芽胞杆菌组合发酵白酒糟，在蛋白提升方面表现优于单一菌种[5]。在发酵工艺方面，研究者对水分、温度、时间等关键参数进行了系统优化[6]，进一步提升了发酵效率，这些研究为白酒糟的饲料化利用奠定了基础。与此同时，固态发酵在改善植物基饲料营养品质方面的研究也逐渐深入。有学者采用酿酒酵母与马氏克鲁维酵母共培养体系发酵基质，结合16S rRNA测序、ITS测序和非靶向代谢组学，系统分析了固态发酵过程中微生物与代谢物的动态演变，共鉴定出826种代谢物，揭示了氨基酸水平和相关代谢通路是发酵过程中被显著重塑的关键[7]。同时，有研究利用两步固态发酵处理玉米-豆粕饲料，并结合代谢组学技术，证实能够有效解析发酵过程中差异代谢物的变化规律及其与微生物群落的关联，共鉴定出229种显著差异代谢物[8]。近年来，代谢组学在酒糟研究中的应用亦崭露头角，有研究采用广泛靶向代谢组学技术对清香型白酒糟进行深度分析，共鉴定出1 869种水溶性代谢物，其中887种为首次在酒糟中报道的新化合物，有力证明了酒糟中蕴含着丰富的活性分子[9]。然而，现有关于白酒糟固态发酵的研究仍主要集中在工艺参数优化和常规营养指标评价层面，将非靶向代谢组学应用于白酒糟双菌固态发酵、从代谢物谱整体变化角度解析发酵产物品质特征的研究仍较为有限。

本研究在工艺优化基础上，以代谢组学为核心，结合营养、安全及消化特性多维度品质评价，系统解析双菌固态发酵白酒糟蛋白原料的代谢物谱特征，从代谢通路层面揭示蛋白定向富集的分子机制，建立基于代谢组学的综合评价体系，为白酒糟高值化利用提供理论依据与技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料 干丢糟（经晾晒除杂处理）：由四川宜宾某酒厂提供；麸皮：市售。

1.1.2 试验试剂 甲醇、乙腈、乙酸、氨水、异丙

醇、4-辛醇均为色谱纯；盐酸、硫酸、氢氧化钠、硫酸钾、硫酸铜、PB磷酸盐缓冲溶液、胃蛋白酶、胰酶等常规试剂均为分析纯。

1.1.3　试验仪器　石墨消解仪（山东海能科学仪器有限公司）；全自动凯式定氮仪、脂肪测定仪，均为海能未来技术集团股份有限公司生产；超纯水仪（深圳市雷德邦电子有限公司）；离心机、超高效液相、高分辨质谱均为Thermo Fisher Scientific生产；气相色谱–质谱联用仪（美国安捷伦公司）。

1.1.4　菌种　酿酒酵母9080（*Saccharomyces cerevisiae* 9080），为本实验室保藏；产朊假丝酵母1769（*Candida utilis* 1769）：购自CICC。前期多菌株筛选试验结合菌体干重、蛋白含量及单细胞蛋白产量综合评价，证实上述两菌株生物量积累与产蛋白性能最优，因此确定为本研究白酒糟固态发酵专用菌株（附图1）。

1.1.5　培养基　产朊假丝酵母1769培养基：葡萄糖30 g/L，酵母浸粉20 g/L，pH 5.5，121 ℃灭菌20 min。

酿酒酵母9080培养基：葡萄糖10 g/L，蛋白胨30 g/L，pH 5.0，121 ℃灭菌20 min。

1.2　方法

1.2.1　种子液制备　将活化完成的酿酒酵母9080和产朊假丝酵母1769分别接种至液体培养基中，分别置于28 ℃、160 r/min和32 ℃、180 r/min培养，使菌种处于良好的生长状态。

1.2.2　发酵液制备　酿酒酵母9080与产朊假丝酵母1769分别于5 L发酵罐（装液量65%）中培养，控制条件分别为：搅拌速度300 r/min、通气量2.5 L/min、接种量5%、温度28 ℃培养和搅拌速度500 r/min、通气量3.5 L/min、接种量7%、温度32 ℃培养，使菌种处于良好的生长状态。

1.2.3　酒糟固态发酵蛋白原料条件优化

（1）单因素试验。基于前期研究基础，已设置产朊假丝酵母1769与酿酒酵母9080发酵液体积配比为1∶9、2∶8、3∶7、4∶6、5∶5、6∶4、7∶3、8∶2，共8个梯度开展配比筛选试验。试验结果表明，8∶2配比条件下发酵产物CP、ASP、ASP/CP、TP含量均为各组最优（附图2）。本研究在产朊假丝酵母1769与酿酒酵母9080复合发酵体系（8∶2，v/v）中，进一步考察麸皮添加量（5%、10%、15%、20%、25%）、发酵温度（27、30、33、36、39 ℃）、接种量（2%、6%、10%、14%、18%）、水分含量（未调整、56%、57%、58%、59%、60%）、初始pH（4、5、5.5、6、7、8）、发酵时间（1、2、3、4、5、6 d）对酒糟固态发酵后粗蛋白（crude protein, CP）、酸溶蛋白（acid-soluble protein, ASP）和真蛋白（true protein, TP）含量的影响。

（2）响应面试验。基于单因素试验结果，以发酵温度（A）、接种量（B）、发酵时间（C）作为考察因素，ASP/CP和TP含量（Y）为响应值，采用Box-Behnken试验设计进行三因素三水平的响应面试验优化，试验因素水平见表1。

表1　响应面试验因素水平

Table 1　Factors and levels of response surface experiments

水平 Level	发酵温度(A) Fermentation temperature (℃)	接种量(B) Inoculation amount (%)	发酵时间(C) Fermentation time (d)
-1	27	10	2
0	30	14	3
1	33	18	4

1.2.4　发酵酒糟营养成分及霉菌毒素检测　分别检测空白原料和发酵酒糟营养成分，包括：蛋白成分CP[10]、ASP[11]、TP[12]的测定；粗脂肪：参照脂肪测定仪（索氏提取原理）说明书操作流程测定，计算脂肪含量，公式为：粗脂肪（%）=（m_1–m_0）/m×100%；总酸[13]、水分：利用快速水分测定仪进行测定，综合评价发酵酒糟的营养价值。参考《饲料卫生标准》（GB13078—2017）[14]，分别对空白原料和发酵酒糟进行呕吐毒素（deoxynivalenol, DON）、玉米赤霉烯酮（zearalenone, ZEN）和黄曲霉毒素B_1（aflatoxin B_1, AFB_1）进行检测（按照毒素检测试剂盒操作步骤进行），以初步评估产品安全性。

1.2.5　挥发性风味物质测定　采用顶空固相微萃取（HS-SPME）结合气相色谱–质谱联用（GC-MS）技术对样品挥发性风味物质进行定性和半定量分析，操作步骤参照相关文献并稍作调整，具体如下：

（1）挥发性风味物质提取[15]。取2 g发酵酒糟样品至20 mL顶空进样瓶中，加入6 mL超纯水、2 g NaCl和10 μL内标溶液（4-辛醇，终浓度1 mg/kg），

立即加盖密封。采用DVB/CAR/PDMS三相萃取头，经老化处理后于60 ℃振荡平衡15 min；将萃取头插入样品瓶顶空部分，恒温萃取45 min；萃取完成后于GC进样口250 ℃热解吸3 min，不分流进样。

（2）GC-MS分析[16]。通过DB-WAXUI极性毛细管柱（60 m×0.25 mm×0.25 μm）对目标化合物进行色谱分离。载气为高纯氦气（He，纯度>99.999%），流速2 mL/min；进样口温度250 ℃，不分流进样，吹扫时间3 min。色谱柱升温程序：初始温度40 ℃保持5 min，以4 ℃/min程序升温至250 ℃并保持5 min。质谱条件：电子轰击电离源（EI），电子能量70 eV；传输线温度250 ℃，离子源温度230 ℃，四极杆温度150 ℃；全扫描（Scan）模式采集数据，质荷比（m/z）范围35–350，溶剂延迟2 min。

（3）定性与半定量分析[17]。采用Mass Hunter工作站结合NIST20谱库进行检索比对，筛选Match Factor>85的化合物；经C7-C30正构烷烃标准品计算Kováts保留指数（RI）辅助验证，并通过标准品保留时间比对确证化合物归属。通过目标物与内标物峰面积比值结合相对校正因子计算各风味物质相对含量。

1.2.6 非挥发性风味物质测定 通过非靶向代谢组学（UPLC-Orbitrap MS）方法，对发酵酒糟中的代谢物质进行测定，具体操作步骤如下：

（1）代谢物提取[18-19]。取25 mg样品至EP管中，加入1 000 μL提取液（甲醇：乙腈：水=2：2：1，v/v/v），提取液含同位素标记内标；涡旋混匀30 s后超声。放入匀浆仪中匀浆（35 Hz，4 min），再转移至冰水浴超声5 min，此步骤重复3次；于-40 ℃静置1 h，取300 μL加入96孔过滤板内，将96孔过滤板–收集板组合放入正压装置，缓慢加压至6 psi，持续3 min，从正压装置取下过滤板–收集板组合收集过滤液，上机检测。

（2）LC-MS分析。使用Vanquish（Thermo Fisher Scientific）超高效液相色谱仪，通过Phenomenex Kinetex C18（2.1 mm×50 mm，2.6 μm）液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离[20]。液相色谱A相为水相，含0.01% 乙酸，B相为异丙醇：乙腈（1：1，v/v）。样品盘温度：4 ℃，进样体积：2 μL。Orbitrap Exploris 120质谱仪控制下进行一级、二级质谱数据采集。详细参数如下：Sheath gas flow rate：50 Arb，Aux gas flow rate：15 Arb，Capillary temperature：320 ℃，Full ms resolution：60 000，MS/MS resolution：：15 000，Collision energy：SNCE 20/30/40，Spray Voltage：3.8 kV（positive）或-3.4 kV（negative）。

1.2.7 动物体外模拟消化试验 采用胃–胰蛋白酶两步法模拟动物体外胃–肠消化过程，评价发酵酒糟中蛋白的体外消化率。试验步骤参照Zhu等[21]方法操作，测定消化前后CP、ASP、TP含量并计算CP，ASP、TP消化率，公式如下：

$$\text{蛋白消化率}(\%) = (\text{消化前蛋白含量} - \text{消化后蛋白含量})/(\text{消化前蛋白含量}) \times 100\%$$

1.2.8 数据统计与分析 除特殊说明，所有试验设3次生物学重复。使用Excel 2021对数据进行整理，Origin 2024软件进行试验作图，GraphPad Prism软件进行单因素方差分析（ANOVA），$P<0.05$表示差异显著，结果均以平均值±标准差表示。

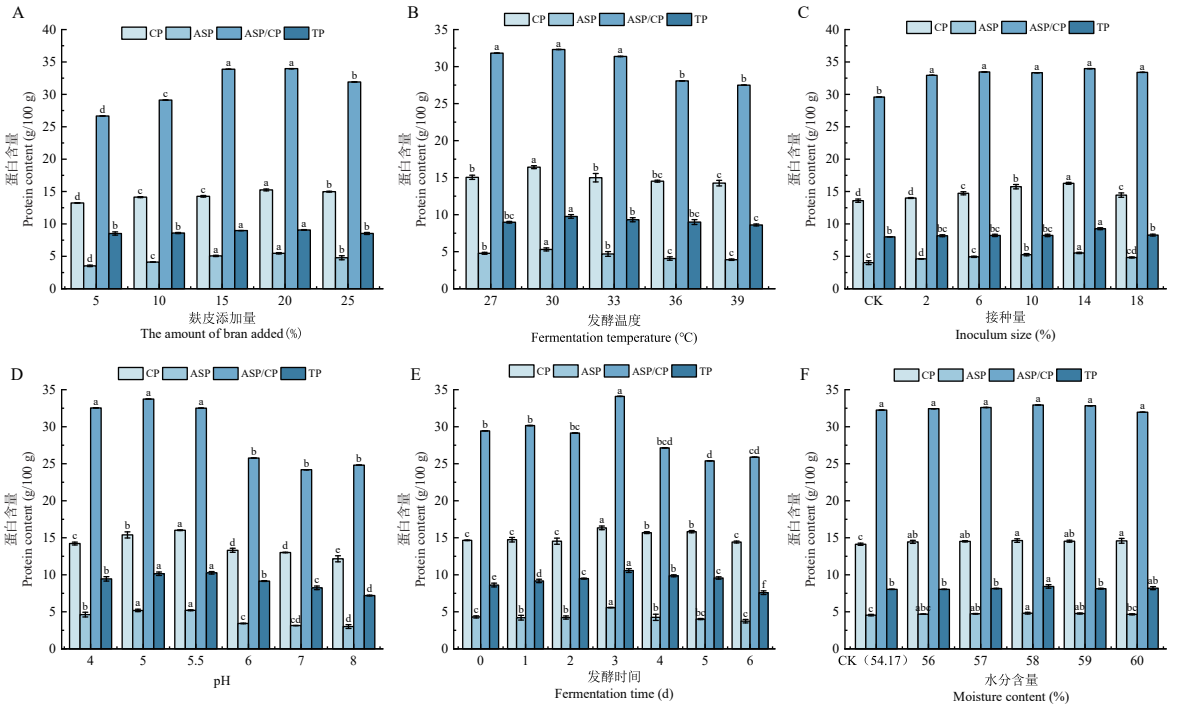
2 结果

2.1 单因素试验结果

通过单因素试验系统优化了麸皮添加量、发酵温度、接种量、初始pH、发酵时间及水分含量对酒糟固态发酵蛋白原料品质的影响，结果如图1所示。总体而言，CP、ASP、TP含量及ASP/CP比值随各因素水平变化多呈先升后降趋势。其中，麸皮添加量于20%时达峰值，CP、ASP、TP含量及ASP/CP比值分别为15.25 g/100 g、5.18 g/100 g、9.07 g/100 g，33.97%，但与15%组差异不显著（$P>0.05$），综合考虑发酵成本，确定麸皮添加量为15%（图1-A）。发酵温度在30 ℃时蛋白指标均达最优（CP 16.42 g/100 g、ASP 5.31 g/100 g、TP 9.76 g/100 g、ASP/CP 32.31%），确定最优发酵温度为30 ℃（图1-B）。接种量14%时各蛋白指标最优（CP 16.27 g/100 g、ASP 5.53 g/100 g、TP 9.27 g/100 g、ASP/CP 33.97%），且与其他接种量组差异显著（$P<0.05$），确定最优接种量为14%（图1-C）。初始pH 5.5时各指标达峰值（CP 16.02 g/100 g、ASP 5.21 g/100 g、TP 10.27 g/100 g、ASP/CP 32.51%），除ASP/CP与pH 4.5组差异不显著（$P>0.05$）外，其余指标与其他pH组差异显著（$P<0.05$），确定最优初始pH为5.5（图1-D）。发酵时间3 d时各指标最优（CP 16.34 g/100 g、ASP 5.57 g/100 g、TP 10.58 g/100 g、

ASP/CP 34.09%），且与其他时间组差异显著（$P<0.05$），确定最优发酵时间为3 d（图1-E）。各指标整体受水分含量影响不显著（$P>0.05$），但在58%时达峰值（CP 14.62 g/100 g、ASP 4.81 g/100 g、TP 8.43 g/100 g、ASP/CP 32.94%），且与空白组差异显著（$P<0.05$），确定最优水分含量为58%（图1-F）。

上述结果表明，产朊假丝酵母与酿酒酵母双菌协同固态发酵白酒糟的适宜工艺参数为：麸皮添加量15%、发酵温度30 ℃、接种量14%、初始pH 5.5、发酵时间3 d、水分含量58%。在此条件下，蛋白品质指标均获得显著提升，双菌之间存在良好的协同效应。



A：麸皮添加量；B：发酵温度；C：接种量；D：初始pH；E：发酵时间；F：水分含量。CP：粗蛋白；ASP：酸溶蛋白；TP：真蛋白。不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$），下同

A: Addition amount of wheat bran. B: Fermentation temperature. C: Inoculation amount. D: Initial pH. E: Fermentation time. F: Moisture content. CP: Crude protein; ASP: acid soluble protein; TP: true protein. Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$). The same below

图1　不同因素对酒糟固态发酵蛋白含量的影响

Fig. 1　Effect of different factors on the protein content in solid-state fermentation of distiller's grains

2.2　响应面试验结果

响应面模型检验结果表明（表2–4），混菌固态发酵白酒糟回归模型极显著（$P<0.000\ 1$），失拟项不显著（$P=0.831\ 0>0.05$），可用于工艺参数优化。各因素对发酵酒糟ASP/CP的影响程度为B>C>A；交互项AC、BC及二次项A^2、B^2、C^2对ASP/CP影响极显著（$P<0.01$），AB交互作用无显著差异（$P>0.05$）。二次回归拟合方程如下：

$$ASP/CP=34.13+0.357\ 9*A+0.515\ 4*B-0.370\ 0*C-0.044\ 3*AB+0.238\ 9*AC+0.456\ 2*BC-2.02*A^2-1.09*B^2-0.646\ 5*C^2$$

$$TP=11.06-0.449\ 2*A-0.044\ 7*B-0.153\ 3*C+0.059\ 4*AB+0.170\ 8*AC-0.091\ 3*BC-0.724\ 6*A^2-0.093\ 6*B^2-0.552\ 9*C^2$$

响应曲面（图2）及等高线图（图3）分析结果显示，AC、BC交互作用对应的曲面坡度陡峭、等高线呈椭圆形，交互效应显著，与方差分析结果一致。经Design-Expert软件优化获得最优工艺参数：发酵温度29.697 ℃、接种量14.556%、发酵时间2.803 d，对应ASP/CP预测值34.16%、TP预测值11.10 g/100 g。

表2 响应面试验结果

Table 2 Results of response surface methodology experiment

试验编号 Test number	发酵温度(A) Fermentation temperature (℃)	接种量(B) Inoculation amount (%)	发酵时间(C) Fermentation time (d)	酸溶蛋白/粗蛋白 ASP/CP (%)	真蛋白 TP (g/100 g)
1	27	10	3	30.09	10.70
2	33	10	3	30.93	9.81
3	27	18	3	31.19	10.55
4	33	18	3	31.86	9.90
5	27	14	2	31.77	10.59
6	33	14	2	31.97	9.22
7	27	14	4	30.47	10.00
8	33	14	4	31.62	9.32
9	30	10	2	32.65	10.58
10	30	18	2	32.79	10.61
11	30	10	4	31.09	10.40
12	30	18	4	33.05	10.06
13	30	14	3	33.95	11.06
14	30	14	3	34.26	11.20
15	30	14	3	34.27	10.98
16	30	14	3	34.02	11.00
17	30	14	3	34.16	11.05

表3 ASP/CP的回归模型方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis of the regression model of ASP/CP

方差来源 Variance source	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F值 F-value	*P*值 *P*-value	显著性 Significance
模型	31.42	9	3.49	245.78	<0.000 1	**
A-温度 (℃)	1.02	1	1.02	72.15	<0.000 1	**
B-接种量 (%)	2.13	1	2.13	149.62	<0.000 1	**
C-时间 (d)	1.10	1	1.10	77.12	<0.000 1	**
AB	0.007 9	1	0.007 9	0.553 1	0.481 3	ns
AC	0.228 2	1	0.228 2	16.07	0.005 1	**
BC	0.832 6	1	0.832 6	58.62	0.000 1	**
A^2	17.24	1	17.24	1 213.61	<0.000 1	**
B^2	4.98	1	4.98	350.89	<0.000 1	**
C^2	1.76	1	1.76	123.91	<0.000 1	**
残差	0.099 4	7	0.014 2			
失拟误差	0.017 8	3	0.005 9	0.290 7	0.831 0	ns
纯误差	0.081 6	4	0.020 4			
总误差	31.52	16				
R^2:0.996 8, R^2_{Adj}:0.970 6, R^2_{Pre}:0.986 8						

Note: * P<0.05; ** P<0.01; ***P<0.001; ns indicates no significant effect (P>0.05). The same below

为适配实际操作，将工艺参数修正为发酵温度30 ℃、接种量15 %、发酵时间3 d。三次验证试验结果显示，优化后ASP/CP、TP较原料分别提升16.38%、29.93%，实测值与模型预测值基本吻合，验证了该模型的可靠性，最终确定混菌发酵最优工艺参数为温度30 ℃、接种量15%、发酵时间3 d。

表4　TP含量的回归模型方差分析结果

Table 4　ANOVA results of the regression model for TP content

方差来源 Variance source	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F值 F-value	*P*值 *P*-value	显著性 Significance
模型	5.78	9	0.642 6	59.75	<0.000 1	**
A-温度（℃）	1.61	1	1.61	150.13	<0.000 1	**
B-接种量（%）	0.016 0	1	0.016 0	1.49	0.261 9	ns
C-时间（d）	0.187 9	1	0.187 9	17.47	0.004 1	**
AB	0.014 1	1	0.014 1	1.31	0.289 4	ns
AC	0.116 6	1	0.116 6	10.84	0.013 2	*
BC	0.033 3	1	0.033 3	3.10	0.121 7	ns
A^2	2.21	1	2.21	205.59	<0.000 1	**
B^2	0.036 9	1	0.036 9	3.43	0.106 4	ns
C^2	1.29	1	1.29	119.70	<0.000 1	**
残差	0.075 3	7	0.010 8			
失拟误差	0.047 0	3	0.015 7	2.22	0.228 4	ns
纯误差	0.028 3	4	0.007 1			
总误差	5.86	16				

R^2:0.987 2，R^2_{Adj}:0.970 6，R^2_{Pre}:0.864 0

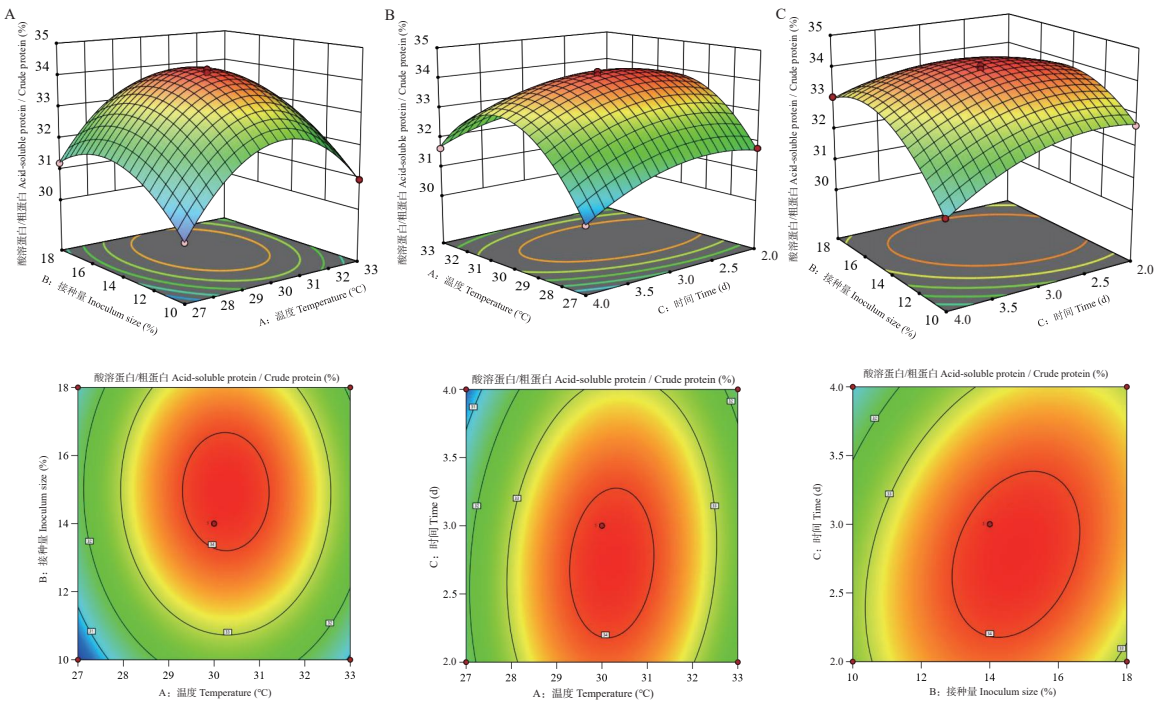


图2　各因素交互作用对ASP/CP含量的影响

Fig. 2　Effect of interaction among various factors on ASP/CP content

2.3　酒糟发酵前后品质对比

酒糟发酵后色泽更加鲜亮，呈黄棕色，气味醇香浓郁并带有酯类果香，质地松软湿润、无霉变结块及异物。从发酵前后酒糟营养指标（表5）变化来

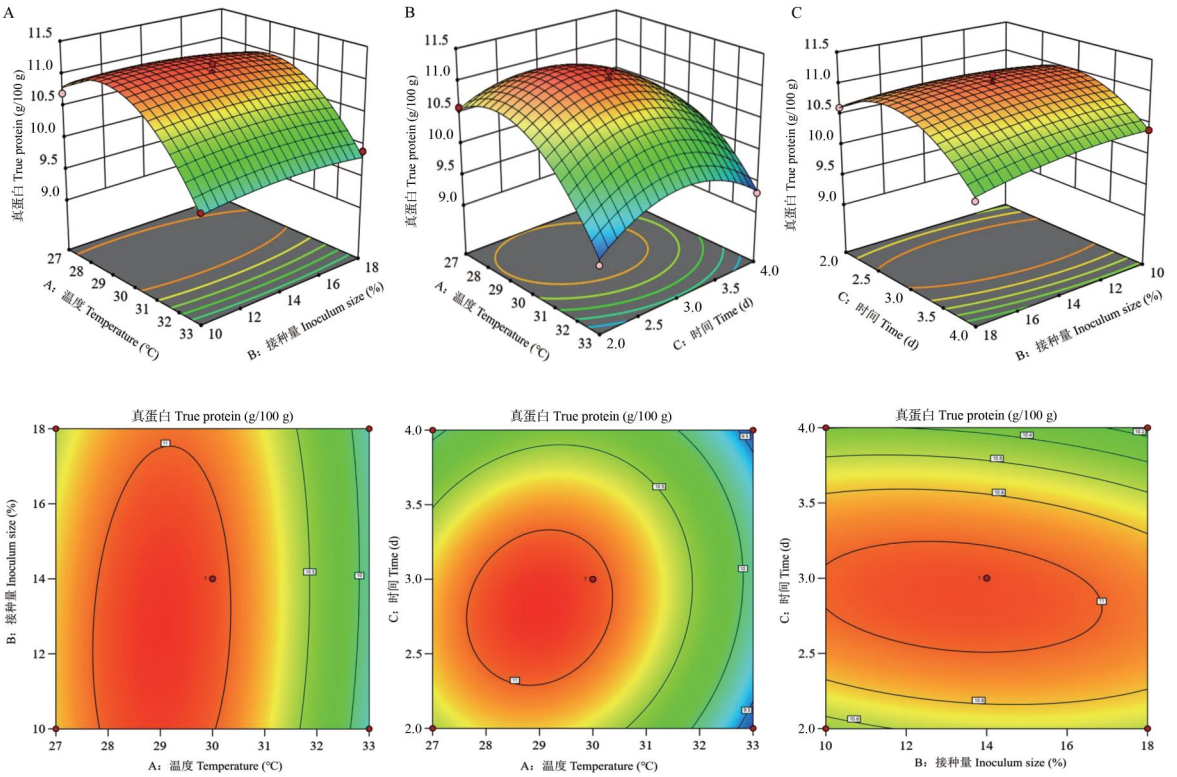


图3 各因素交互作用对TP含量的影响

Fig. 3 Effect of interaction among various factors on TP content

表5 酒糟发酵前后营养指标变化

Table 5 Changes in nutritional indicators of distiller's grains before and after fermentation

组别 Group	粗蛋白 CP(g/100 g)	酸溶蛋白 ASP(g/100 g)	酸溶蛋白/粗蛋白 ASP/CP(%)	真蛋白 TP(g/100 g)	总酸 Total acid (g/kg)	粗脂肪 Ether extract(%)	含水量 Water content(%)
空白原料	14.60±0.25a	4.31±0.15a	29.50±0.01a	8.56±0.05a	12.49±0.31a	2.87±0.01a	52.54±0.01a
发酵酒糟	17.03±0.06b	5.82±0.11b	34.18±0.01b	11.07±0.08b	11.80±0.27b	3.56±0.01a	57.41±0.01b

注：空白原料为固态发酵前基料（含15%麸皮）；发酵酒糟为固态发酵后产品

Note: The blank raw material refers to the substrate before solid-state fermentation (containing 15% wheat bran); fermented distiller's grains represent the product after solid-state fermentation

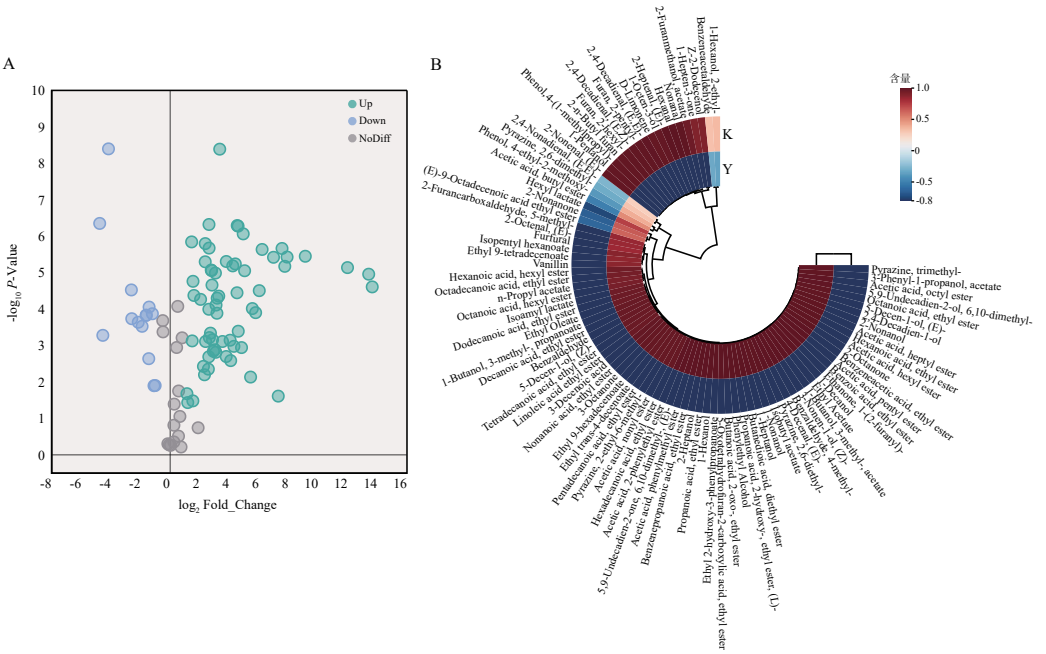
看，发酵酒糟的CP、ASP、TP含量和ASP/CP对比空白原料分别提升16.64%、35.03%、29.32%和15.86%（P<0.05）；总酸由12.49 g/kg降至11.80 g/kg；粗脂肪含量由2.87%升至3.56%，变化不显著（P>0.05）。此外，DON、ZEN、AFB_1在空白原料和发酵酒糟中检测结果均呈阴性（浓度低于检测限或不含有），故二者的安全性符合GB 13078-2017《饲料卫生标准》。

2.4 挥发性风味物质测定

采用HS-SPME/GC-MS分析发酵酒糟挥发性风味组分，共鉴定出9类92种挥发性物质，以酯类物质最为丰富，占比达46.7%。主成分分析（PCA）结果表明（附图3），空白原料与发酵酒糟风味轮廓差异显著，组内样本聚集紧密、组间完全分离，说明混菌发酵显著重塑了酒糟风味代谢谱。以VIP>1.0、P<0.05、$|\log_2 FC|$>1为筛选标准，共得到71种差异风味物质（图4-A），下调58种、下调13种。发酵后酒糟酯类香气物质大量富集，乙酸乙酯、乙酸异戊酯、乙酸苯乙酯含量大幅提升，共同形成花果甜香复合风味；香叶基丙酮与2-乙酰基呋喃有效补充甜香与烘焙香气。同时，己醛、D-柠檬烯等不良风味

物质含量显著降低。发酵过程中醇酸酯化代谢通路被显著激活，风味合成与蛋白代谢可共享乙酰辅酶A前体，实现酒糟风味品质同步优化。

环形层次聚类热图（图4-B）进一步可看出空白原料和发酵酒糟的挥发性化合物组成及相对含量差异显著。在发酵酒糟中，绝大多数酯类化合物含量显著提升，主要包括乙酸乙酯、乙酸异戊酯、乙酸苯乙酯、丙酸乙酯、己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯、月桂酸乙酯、肉豆蔻酸乙酯、棕榈酸乙酯、硬脂酸乙酯、油酸乙酯、亚油酸乙酯、乳酸乙酯及乳酸异戊酯等；此外，醇类化合物如苯乙醇、1-壬醇、1-癸醇、1-己醇、2-庚醇、1-辛烯-3-醇及酮类化合物如2-辛酮、3-辛酮、糠基甲基酮等在发酵酒糟中也表现出较高水平。相比之下，空白原料中上述发酵型酯类、醇类及酮类化合物含量极低，而部分原料特征性化合物如己醛、壬醛、2,4-癸二烯醛、D-柠檬烯、2-戊基呋喃及4-（1-甲基丙基）苯酚等则呈现出相对较高的本底含量。聚类分析显示，化合物依据其在空白原料、发酵酒糟间的含量差异可明显区分为不同簇群，表明混菌发酵显著改变了原料的挥发性风味轮廓，发酵酒糟形成了典型的发酵香气特征。



K：空白原料；Y：发酵酒糟。下同

K: Blank raw materials; Y: fermented distiller's grains. The same below

图4　空白原料和发酵酒糟的差异风味物质筛选火山图（A）与环形层次聚类热图（B）

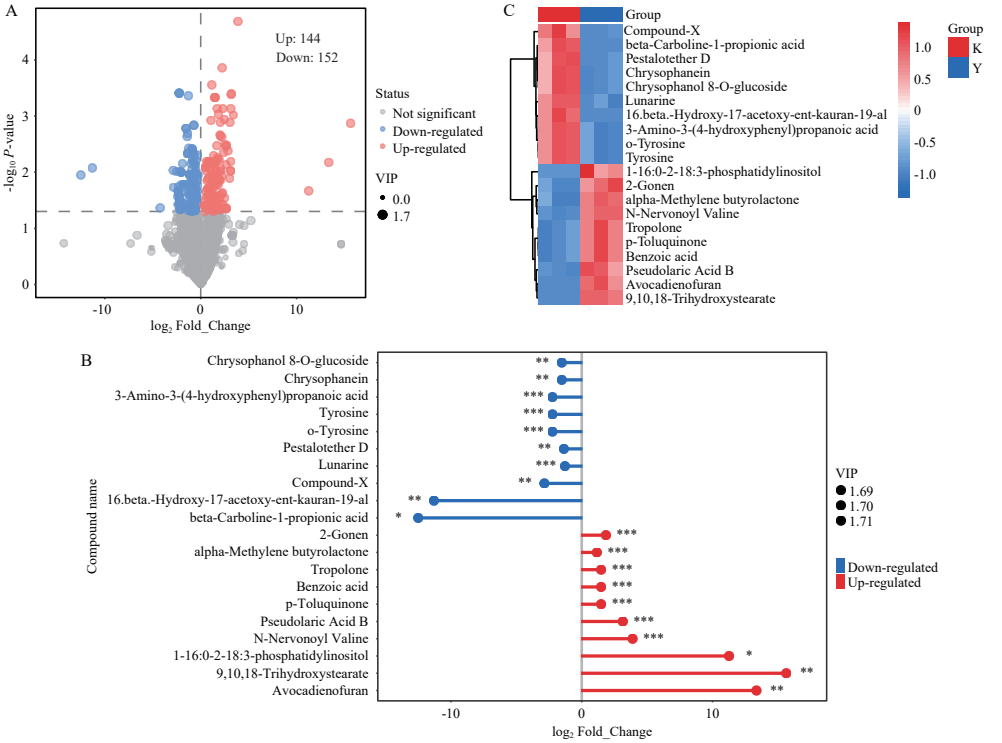
Fig. 4　Volcanic map (A) and circular hierarchical clustering heat map (B) for screening differential flavor substances between blank raw materials and fermented distiller's grains

2.5　非挥发性风味物质测定

PCA与OPLS-DA分析结果（附图4和附图5）表明，空白原料与发酵酒糟样本组内聚集良好、组间完全分离，发酵处理显著重塑了酒糟的代谢轮廓，且构建的代谢组判别模型无过拟合、稳定性与可靠性良好，可用于差异代谢物筛选。

火山图结果显示（图5-A），样本间共筛选得到296种显著差异代谢物，其中上调144种、下调152种，整体表现为代谢物新生合成与富集效应主导，而非单一的底物消耗。在空白原料和发酵酒糟的两两比较中，基于VIP值>1及P<0.05的标准，从296种差异代谢物中选出VIP值最高的前20种进行详细分析（图5-B），揭示了10种上调代谢物和10种下调代谢物。上调的代谢物则主要为脂类衍生

物、有机酸、醌类、萜类及内酯类化合物。具体包括9,10,18-三羟基硬脂酸、N-神经酰缬氨酸、牛油果呋喃、1-16:0-2-18:3-磷脂酰肌醇等脂类及脂肽衍生物；苯甲酸、对甲苯醌等芳香族有机酸及醌类；土槿酸B、托酚酮等萜类及生物碱类；以及α-亚甲基-γ-丁内酯和2-Gonen等酮类及内酯衍生物。这些化合物在发酵酒糟中显著富集，表明混菌发酵促进了新型微生物代谢产物的合成与积累。下调的代谢物主要包括酒糟基料中芳香族氨基酸类及其衍生物、蒽醌类、生物碱类。具体包括：酪氨酸、邻酪氨酸、3-氨基-3-(4-羟基苯基）丙酸等；大黄酚-8-O-葡萄糖苷、大黄酚等蒽醌苷及苷元；β-咔啉-1-丙酸、月桂碱等生物碱。这些化合物在空白原料中含量较高，在发酵酒糟中显著降低，表明其在混菌发酵过程中被显著消耗或转化。聚类分析热图显示（图5-C），上述20种差异代谢物可依据其在空白原料和发酵酒糟中的含量差异区分为两个簇群：空白原料中主要富集氨基酸类、蒽醌苷类及生物碱类化合物，而发酵酒糟中则显著富集脂类衍生物、酚酸/醌类及萜类代谢物，表明混菌发酵重塑了原料的非挥发性代谢物。



Note: Compound-X: (1S,6S,9S,10R,14R,17S,19S)-12-ethyl-9,19-dihydroxy-17-methoxy-14-methyl-5-oxa-12-azahexacyclo [8.7.2.1~2,6~.0~1,11~.0~3,9~.0~14,18~] icosan-4-one

图5 空白原料和发酵酒糟的差异代谢物火山图(A)、火柴杆图(B)和层次聚类热图(C)

Fig. 5 Volcano plot (A), matchstick plot (B) and hierarchical clustering heat map (C) of differential metabolites between blank raw material and fermented distiller's grains

KEGG富集（图6）结果可知，差异代谢物显著富集于菌体中谷氨酸等氨基酸生物合成（rich factor 0.12，P<0.002 5）、2-氧代羧酸代谢、丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢及甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢等通路（P<0.05）。通路间存在显著的代谢物交集与功能耦联：α-酮戊二酸、丙酮酸等差异代谢物同时注释于2-氧代羧酸代谢与氨基酸生物合成通路，表明中心碳代谢通过提供碳骨架前体与后者直接相连；丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢通路富集到谷氨酸和天冬氨酸，通过转氨基作用将氨基整合至上述碳骨架；甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢通路则富集丝氨酸，经丝氨酸羟甲基转移酶催化提供一碳单位，为嘌呤合成及甲基化反应供能。通过共享代谢物形成功能连续的代谢流，将碳源与氮源定向导入氨基酸生物合

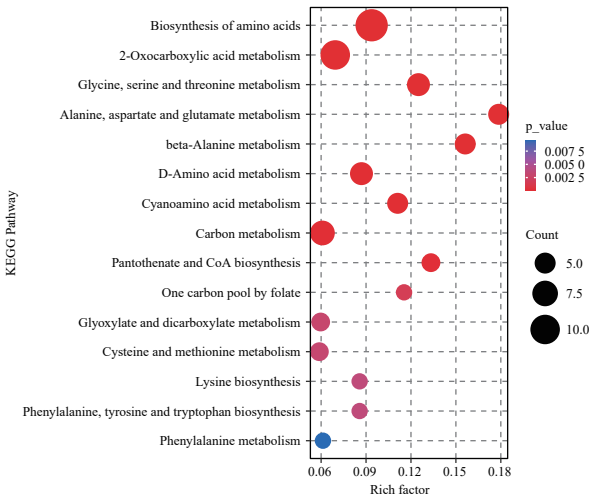


图6　空白原料和发酵酒糟的差异代谢物KEGG富集图

Fig. 6　KEGG enrichment plots of differential metabolites between blank raw materials and fermented distiller's grains

成通路，实现氮素向蛋白质的高效转化。

2.6　体外模拟消化率评价

由图7可知，发酵酒糟的CP、ASP和TP体外消化率分别为51.37%、76.63%和56.78%，较空白原料均显著升高（P<0.05），分别高出7.63%、25.29%、9.06%。其中，ASP消化率提升最大，表明发酵处理显著促进了酒糟蛋白向小分子肽和游离氨基酸的转化，有望作为蛋白饲料添加剂或功能性饲料原料进行开发利用。

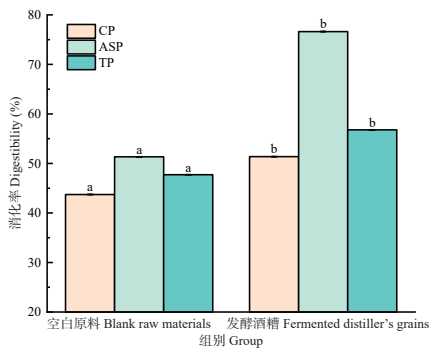


图7　空白原料与发酵酒糟体外模拟消化后各蛋白成分消化率

Fig. 7　*In vitro* digestibility of individual protein fractions in blank raw material and fermented distiller's grains after simulated digestion

3　讨论

3.1　白酒糟发酵代谢物谱整体变化特征

非靶向代谢组学PCA与OPLS-DA分析显示，空白原料与发酵酒糟沿PC1轴完全分离表明发酵引起了代谢物谱的根本性重塑。共筛选出20个显著差异代谢物（10个上调、10个下调），主要聚焦于发酵前后显著变化及其与品质的关联，一定程度上可反映混菌发酵的核心代谢效应。上调代谢物以脂类衍生物为主，其中磷脂酰肌醇及神经酰胺类鞘脂（如肌醇磷酸神经酰胺）是酵母细胞膜磷脂双分子层的特征结构组分，其富集与发酵过程中菌体生物量的积累密切相关[22-23]。萜类衍生物如托酚酮的上调可能与次生代谢激活有关，部分萜类具有抗氧化活性，对产物储存稳定性具有潜在益处[24]。下调代谢物中，如酪氨酸、邻酪氨酸等芳香族氨基酸下降反映混菌体系对基质中游离氨基酸的高效同化利用[25]。蒽醌类化合物（大黄酚-8-O-葡萄糖苷等）的显著下调尤为关键，该类物质（如大黄酚、大黄素、芦荟大黄素及其糖苷）具有潜在肝毒性和致泻作用[26]。其糖苷形式的降解可能归因于发酵体系中微生物分泌的糖苷酶（如β-葡萄糖苷酶）对糖苷键的水解作用[27]，这与固态发酵中蒽醌代谢通路被激活的现象一致[28]，从代谢层面说明了发酵对酒糟安全性的改善。KEGG通路富集分析进一步揭示代谢重塑的核心路径：氨基酸生物合成通路富集最显著，并与2-氧代羧酸代谢、丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢及甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢形成功能耦联网络，共同驱动碳氮源向菌体生物量的定向转化。

3.2　代谢变化与蛋白品质提升的关联

代谢组学结果从分子层面解释了蛋白品质提升的内在原因，ASP/CP的提升尤为关键，因为ASP主要包括小肽和游离氨基酸，其占比增加意味着蛋白的溶解性和酶解敏感性得到改善[29]。KEGG通路富集显示，氨基酸生物合成通路富集最显著，并与2-氧代羧酸代谢、丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢形成功能耦联网络，共同驱动碳氮源向菌体生物量的定向转化[30]。这一“碳架供应-氮同化-氨基酸合成”的代谢流将酒糟中的残糖与非蛋白氮定向导入单细胞蛋白合成，实现蛋白总量的生物富集。与司维江

等[31]采用酿酒酵母、黑曲霉、米曲霉混菌发酵酱香型酒糟后TP提升16.41%的结果相比，本研究TP增幅达29.32%，且通过代谢组学从通路层面揭示了蛋白富集的分子基础，同时ASP显著提升（35.03%），表明本体系在蛋白品质改良（小肽富集）方面更具优势，而非简单的生物量积累。游离氨基酸的显著下调与蛋白含量的上升形成逻辑闭环，推测这些氨基酸被酵母高效同化用于菌体蛋白合成。与Chen等[32]采用益生菌协同外源复合酶（葡聚糖酶、甘露聚糖酶、木聚糖酶）发酵酒糟使粗蛋白提升31.25%、三氯乙酸可溶性蛋白（TCA-SP）提升36.68%的研究相比，本研究双酵母体系未添加外源酶制剂，仅依靠内源性蛋白酶系即实现了ASP提升35.03%，且体外消化试验中ASP消化率较空白原料高出25.29%，在蛋白预消化与小分子化方面具有独特优势，进一步证实了代谢通路重构驱动了蛋白结构向小分子化、高溶解性转变。

3.3 代谢变化与风味品质及安全性的关联

混菌固态发酵引发了酒糟风味轮廓的根本性重塑，HS-SPME/GC-MS共鉴定出9类92种挥发性风味物质，其中酯类43种占主导，乙酸乙酯、乙酸苯乙酯及乙酸异戊酯含量显著增加。酯类的富集可归因于发酵体系中微生物代谢产生的醇类与有机酸经酯化反应大量合成：残糖经糖酵解途径转化为乙醇，同时产生乙酰辅酶A等前体，在醇酰基转移酶催化下形成乙酸乙酯等酯类风味物质[33]，该代谢流的激活赋予了酒糟原料花果香的风味。与此同时，己醛等不良风味物质含量显著下调，可能归因于发酵初期微生物快速耗氧形成的微厌氧环境抑制了脂氧合酶介导的脂质过氧化反应，且发酵产生的乙醇对醛类具有还原作用[34]。现有研究多集中于蛋白含量提升而忽视适口性改良[35-37]，本研究通过风味组学明确了混菌发酵在富集蛋白的同时可系统性重塑酒糟风味轮廓，形成特征性花果香体系，这对提高动物采食量具有重要意义。安全性方面，空白原料及发酵酒糟中DON、ZEN及AFB_1检测均为阴性，符合GB 13078-2017标准，表明原料本身毒素含量极低且发酵过程未引入外源污染。代谢组学进一步揭示蒽醌类抗营养因子显著下调，说明混菌发酵在维持毒素零检出的同时，通过微生物酶系生物转化降低了固有抗营养因子含量。与Jia等[38]采用合成菌群技术主动降解霉菌毒素的策略不同，本研究在未添加外源抑菌剂的条件下，通过在产朊假丝酵母与酿酒酵母混菌菌液接种量15%条件下，于发酵初期快速建立种群优势，通过营养与生态位竞争抑制产毒霉菌定植[39]。本研究为白酒糟高值化利用制备单细胞蛋白原料提供了代谢组学数据支撑与品质评价新视角，同时为白酒糟高值化利用、新型蛋白饲料原料开发及白酒产业循环经济模式构建提供了理论依据与技术支撑。

4 结论

产朊假丝酵母与酿酒酵母双菌固态发酵可显著提升白酒糟粗蛋白、酸溶蛋白及真蛋白含量，改善蛋白品质与风味特性，降低体外消化率与安全性风险，表现出优异的蛋白富集和品质提升潜能。基于代谢组学技术，共鉴定出92种挥发性风味物质及296个差异代谢物，其中酯类、脂类及萜类衍生物显著上调，氨基酸及蒽醌类显著下调，KEGG富集揭示氨基酸生物合成等4条代谢通路被激活，从分子层面解析了蛋白品质优化的代谢特征。

文章所有附图附表请点击链接查看（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260916145056_NewsFile_3.pdf）。

参考文献

[1] Liu L, Rong WH, Du X, et al. Integrating experimental and computational analyses of yeast protein profiles for optimizing the production of high-quality microbial proteins [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2024, 196(12): 8741-8762.

[2] 黄志东, 张翘楚, 李惠惠, 等. 菌体蛋白作为饲料蛋白原料的研究进展 [J]. 饲料工业, 2023, 44(10): 16-21.
Huang ZD, Zhang QC, Li HH, et al. Research progress of bacterial protein as feed protein raw material [J]. Feed Ind, 2023, 44(10): 16-21.

[3] 唐哲仁, 高勇, 师雄, 等. 白酒酒糟资源化利用技术研究进展 [J]. 中国酿造, 2024, 43(8): 13-19.
Tang ZR, Gao Y, Shi X, et al. Research progress on resource utilization techniques of Chinese Baijiu distiller's grains [J]. China Brew, 2024, 43(8): 13-19.

[4] Liang ZQ, Wang Z, Shen XJ, et al. Utilization of synthetic microbial community in solid-state fermentation (SMC-SSF) for

converting Chinese distiller grains into protein feed [J]. Chem Biol Technol Agric, 2025, 12: 104.

[5] Qiao L, Wang K, Xin X, et al. Upcycling of Chinese Nong-flavor Baijiu distiller's grains through solid-state fermentation by microbial-enzyme synergy [J]. Fermentation, 2026, 12(1): 13.

[6] 时伟, 张熙琳, 郑红梅, 等. 混菌固态发酵清香型白酒糟制备蛋白饲料的研究 [J]. 饲料研究, 2024, 47(4): 79-84.
Shi W, Zhang XL, Zheng HM, et al. Research on mixed solid-state fermentation of pure flavor distiller's grains for protein feed production [J]. Feed Res, 2024, 47(4): 79-84.

[7] Xu ZX, Ying C, Bai PX, et al. Microbial dynamics, metabolite profiles, and chemical composition in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* co-culture during solid-state fermentation [J]. Food Biosci, 2025, 64: 105849.

[8] Wang C, Wei SY, Jin ML, et al. Integrated microbiomic and metabolomic dynamics of fermented corn and soybean by-product mixed substrate [J]. Front Nutr, 2022, 9: 831243.

[9] Hu SQ, Zeng YT, Liu HQ, et al. Systematic profiling and bioactivity evaluation of Jiuzao from light flavor Baijiu: a by-product rich in bioactive compounds [J]. Food Chem, 2025, 494: 146229.

[10] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定: GB 5009.5—2025 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2025.
National Health Commission of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation. National Food Safety Standard Determination of Protein in Food: GB 5009.5—2025 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2025.

[11] 中华人民共和国农业农村部. 饲料原料中酸溶蛋白测定: NY/T 3801—2020 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2020.Determination of acid-soluble protein in feed ingredients: NY/T 3801—2020 [S]. Beijing: China Agriculture Press, 2020.

[12] 王妍, 郑猛虎, 崔欣雨, 等. 微生物固态发酵工艺对红薯淀粉渣真蛋白含量的影响 [J]. 饲料工业, 2022, 43(9): 35-40.
Wang Y, Zheng MH, Cui XY, et al. Effect of microbial solid state fermentation process on the true protein content of sweet potato starch residue [J]. Feed Ind, 2022, 43(9): 35-40.

[13] 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中总酸的测定: GB 12456—2021 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2021.
National Health Commission of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation. National Food Safety Standard Determination of Total Acids in Food: GB 12456—2021 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2021.

[14] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料卫生标准: GB 13078—2017 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Hygienical standard for feeds: GB 13078—2017 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.

[15] Babič K, Strojnik L, Ćirić A, et al. Optimization and validation of an HS-SPME/GC-MS method for determining volatile organic compounds in dry-cured ham [J]. Front Nutr, 2024, 11: 1342417.

[16] Deng J, He CJ, Wei CH, et al. Characterization of fermentation parameters, volatile compounds and microbial community structure of fermented grains in the upper and lower layers during strong-flavor Baijiu fermentation [J]. Bioresour Bioprocess, 2025, 12: 105.

[17] Xu J, Zhang T, Chen HT, et al. Study on the fermented grain characteristics and volatile flavor substances during the tuqu fermentation of Hunan light-flavor Baijiu [J]. Foods, 2024, 13 (6): 899.

[18] Doppler M, Kluger B, Bueschl C, et al. Stable isotope-assisted evaluation of different extraction solvents for untargeted metabolomics of plants [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(7): 1017.

[19] Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry [J]. Nat Protoc, 2011, 6(7): 1060-1083.

[20] Want EJ, Wilson ID, Gika H, et al. Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS [J]. Nat Protoc, 2010, 5(6): 1005-1018.

[21] Zhu XF, Wang LY, Zhang Z, et al. Combination of fiber-degrading enzymatic hydrolysis and lactobacilli fermentation enhances utilization of fiber and protein in rapeseed meal as revealed in simulated pig digestion and fermentation *in vitro* [J]. Anim Feed Sci Technol, 2021, 278: 115001.

[22] Schützhold V, Hahn J, Tummler K, et al. Computational modeling of lipid metabolism in yeast [J]. Front Mol Biosci, 2016, 3: 57.

[23] Du F, Xu Q, Li X, et al. Author Correction: Regulating triacylglycerol cycling for high-efficiency production of polyunsaturated fatty acids and derivatives [J]. Nat Commun, 2025, 16: 10314.

[24] He MX, Peng Q, Xu XQ, et al. Antioxidant capacities and non-volatile metabolites changes after solid-state fermentation of soybean using oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) Mycelium [J]. Front Nutr, 2024, 11: 1509341.

[25] Li T, Deng MS, Li S, et al. Revealing differences in flavor compounds during plum wine fermentation using single and mixed yeast strains through metabolomic analysis [J]. Food Chem X, 2025, 25: 102100.

[26] Xie J, Zhang JF, Chen XY. *Aloe*-emodin: from pharmacological mechanisms to clinical applications and future perspectives [J]. Front Pharmacol, 2026, 16: 1741679.

[27] Wang DP, Wang XH, Yu XJ, et al. Pharmacokinetics of

anthraquinones from medicinal plants [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 638993.

[28] Zhang YJ, Xie YX, Ma J, et al. Mechanisms of anti-nutritional factor degradation and quality enhancement in soybean meal via Rpf-mediated microbiota synergy and *Bacillus* reinforcement during solid-state fermentation [J]. Front Anim Sci, 2025, 6: 1707154.

[29] Chi ZH, Feng Y, Wei XK, et al. A co-fermentation technology based on small peptide production and protein structure modification increases the edible value of corn gluten meal [J]. LWT, 2024, 198: 116054.

[30] Huang YY, Meng K, Liu GH, et al. Whole genome sequencing and extracellular metabolite profiling of lactiplantibacillus plantarum FRT4: insights into probiotic functionality [J]. Biology, 2025, 14 (9): 1167.

[31] 司维江, 刘建忠, 黄德利, 等. 白酒糟饲料化利用菌种的筛选及工艺优化 [J]. 饲料研究, 2022, 45(8): 67-72.
Si WJ, Liu JZ, Huang DL, et al. Screening and process optimization of bacteria for fodder utilization of distiller's grains [J]. Feed Res, 2022, 45(8): 67-72.

[32] Chen K, Deng XR, Jiang DH, et al. Efficient conversion of distillers grains as feed ingredient by synergy of probiotics and enzymes [J]. Front Microbiol, 2024, 15: 1403011.

[33] 周永秀, 卢开华, 刘秦明, 等. 咖啡风味成分研究进展 [J]. 食品科学, 2025, 46(10): 387-396.
Zhou YX, Lu KH, Liu QM, et al. Research progress on coffee flavor components [J]. Food Sci, 2025, 46(10): 387-396.

[34] Liu YL, Cao YT, Yohannes WK, et al. Antioxidant effect of yeast on lipid oxidation in salami sausage [J]. Front Microbiol, 2023, 13: 1113848.

[35] 陆思檬. 饲用发酵白酒糟工艺优化及其对蛋鸡的影响 [D]. 太原: 山西大学, 2022.
Lu SM. Technology optimization of fermentation distiller's grains feedstuff and its effect on laying hens [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2022.

[36] 张硕清, 汝昕潼, 穆永强, 等. 白酒糟与玉米油渣协同固态发酵工艺优化及体外营养价值评定 [J]. 中国粮油学报, 2026, 41(1): 170-178.
Zhang SQ, Ru XT, Mu YQ, et al. Process optimization and *in vitro* nutritional value evaluation of solid-state co-fermentation of distiller's grains and corn oil residue [J]. J Chin Cereals Oils Assoc, 2026, 41(1): 170-178.

[37] Zhang L, Shen XJ, Wang Z, et al. Production of high-nutrient protein sources by pre-secondary solid-state fermentation of functional microbiota (Pre-Sec-SSF-FM) from dehulled Chinese distillers grains [J]. J Biotechnol, 2026, 410: 23-32.

[38] Jia R, Lu SM, Li T, et al. Production technology of fermented distiller's grains and its effect on production performance and egg quality of laying hens [J]. Fermentation, 2025, 11(9): 492.

[39] Adeldruvefors U, Schnurer J. Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of wheat grain [J]. FEMS Yeast Res, 2005, 5(4-5): 373-378.

（责任编辑　朱琳峰）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):297-308

构建可利用酸解液表达外源蛋白的谷氨酸棒状杆菌工程菌

樊子铭[1] 邹宇[1] 叶荣泰[1] 白仲虎[1,2] 刘秀霞[1,2*]
（1.江南大学生物工程学院,无锡 214026；2.江南大学粮食发酵与食品生物制造国家研究工程中心,无锡 214026）

摘 要：【目的】探索谷氨酸棒状杆菌工程菌利用玉米秸秆酸解液的可行性，为木质纤维素废弃物低成本利用提供新思路。【方法】通过单因素实验筛选出有助于酸解液利用的成分，过表达谷氨酸棒状杆菌内源的肌醇-3-磷酸合酶基因*ino-1*和甲硫氨酸亚砜还原酶基因*msrA*提高宿主抗氧化能力。通过更换启动子的方式提高基因组反向转运蛋白Mrp1的表达，结合适应性实验室进化与过表达来自酿酒酵母的二联体蛋白*ADY2*基因提高宿主乙酸利用能力，最后通过模式蛋白mCherry、来自枯草芽胞杆菌的α-淀粉酶，以及骆驼抗体片段VHH，验证工程菌利用酸解液表达外源蛋白的可行性。【结果】野生型菌株无法直接利用酸解液生长，向水解液中补充氮源或1 mmol/L $MgSO_4$和0.1 mmol/L $CaCl_2$可实现菌株生长。过表达*ino-1*与*msrA*基因使宿主在酸解液中生长的最大细胞密度分别提高66.98%和73.18%。进化菌株Evo90在添加0.8 g/L葡萄糖+70 g/L乙酸钠的培养基中的生长状况优于野生型，结合*mrp1*、*ino-1*与*ADY2*的过表达，工程菌在水解液中达到生长稳定期的时间缩短约40%。最终，工程菌成功利用水解液分泌表达3种外源蛋白，其中mCherry产量相当于利用35 g/L葡萄糖发酵，单位细胞密度的荧光强度最高可达到利用50 g/L葡萄糖发酵的10.18倍左右。【结论】向酸解液中添加氮源或Mg^{2+}、Ca^{2+}可使菌株在酸解液中正常生长；结合菌株抗氧化及乙酸利用能力的工程改造，可实现谷氨酸棒状杆菌工程菌利用酸解液表达异源蛋白。

关键词： 乙酸；木质纤维素；替代碳源；绿色生产；谷氨酸棒状杆菌
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0197

Construction of Engineered *Corynebacterium glutamicum* for Heterologous Protein Expression Using Acid Hydrolysate

FAN Zi-ming[1] ZOU Yu[1] YE Rong-tai[1] BAI Zhong-hu[1,2] LIU Xiu-xia[1,2*]
（1. *School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi* 214026; 2. *National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi* 214026）

Abstract:【Objective】This study explored the feasibility of using engineered *Corynebacterium glutamicum* to utilize corn stover acid hydrolysate, providing a new approach for the low-cost utilization of lignocellulosic waste.【Method】Single-factor experiments were conducted to identify components that facilitate the utilization of acid hydrolysate. The endogenous genes *ino-1* (encoding inositol-3-phosphate synthase) and *msrA* (encoding methionine sulfoxide reductase) were overexpressed in *Corynebacterium glutamicum* to enhance the host's antioxidant capacity. The expression of the antiporter Mrp1 was enhanced by promoter replacement. Adaptive laboratory evolution and overexpression of the *ADY2* gene (encoding a paired protein from *Saccharomyces cerevisiae*) were then employed to improve host acetate utilization. Finally, the feasibility of using the engineered strain to produce heterologous proteins from acid hydrolysate was validated using the model protein mCherry, α-amylase from *Bacillus subtilis*, and the camelid antibody fragment VHH.【Result】The wild-type strain could not grow directly on acid hydrolysate. However, supplementation of the hydrolysate with a nitrogen source or with 1 mmol/L $MgSO_4$ and 0.1 mmol/L $CaCl_2$ enabled strain growth. Overexpression of the *ino-1* and *msrA* genes increased the maximum cell density of the host grown in acid hydrolysate by 66.98% and 73.18%,

收稿日期：2026-02-09
基金项目：河南省重点研发专项（251111310300）
*通信作者：刘秀霞 liuxiuxia@jiangnan.edu.cn

respectively. The evolved strain Evo90 exhibited better growth than the wild type in medium supplemented with 0.8 g/L glucose and 70 g/L sodium acetate. Furthermore, when combined with overexpression of *mrp1*, *ino-1*, and *ADY2*, the engineered strain reached stationary phase in acid hydrolysate approximately 40% faster than the unmodified strain. Ultimately, the engineered strain successfully secreted three heterologous proteins using the hydrolysate. The mCherry yield exceeded that achieved with 35 g/L glucose, and the maximum fluorescence intensity per unit cell density reached approximately 10.18-fold to fermentation with 50 g/L glucose.【Conclusion】Supplementation of the acid hydrolysate with a nitrogen source or with Mg^{2+} and Ca^{2+} supported normal growth of the strain. Together with engineering modifications that enhanced antioxidant capacity and acetate utilization, the engineered *C. glutamicum* was able to secrete heterologous proteins using the acid hydrolysate.

Keywords: acetate; lignocellulose; alternative carbon sources; green production; *Corynebacterium glutamicum*

传统微生物发酵工业高度依赖葡萄糖等可食用基质作为碳源，这不可避免地导致了“与人争粮”的伦理争议并抬高了生产成本。开发廉价且可持续的非粮碳源替代品（如木糖等还原糖、有机酸、一碳和二碳化合物）已成为该领域的研究热点[1-2]。乙酸广泛存在于木质纤维素生物质、C1气体及工业废水中，也是微生物发酵的主要副产品。通过微生物利用廉价乙酸资源生产化学品，是实现碳资源回收利用和绿色生物制造的重要途径[3]。

农业废弃物（如作物残渣、木材，或其他木质纤维素生物质）的回收分解和利用代替了传统的焚烧，这引起了人们对利用这种可持续、廉价资源的关注[4]。利用木质纤维素资源前，往往需要通过水解将这些材料糖化为可发酵糖。相比于酶水解法，酸水解的工艺流程短，操作简单，成本更低，但水解产物的糖品质较差，易产生发酵抑制[5]。木质纤维素生物质（如玉米秸秆等）经酸水解会生成富含葡萄糖、乙酸及多种抑制物（醛类、酚类等）的混合液[6]，这些抑制物会显著阻碍细胞生长以及后续的产物合成[6-8]。尽管脱毒处理可以缓解此问题，但高昂的成本限制了其商业化应用[2, 6]。因此，开发高耐受并可以利用水解液碳源的微生物菌株是突破这一瓶颈的有效方案。

谷氨酸棒状杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）作为重要的工业生产菌株，在表达外源蛋白方面也具有许多优势[9]。研究表明，谷氨酸棒状杆菌可以以乙酸为唯一碳源，或利用木质纤维素水解液碳源（多为葡萄糖与木糖）合成有用化学品[10-14]。但关于谷氨酸棒状杆菌利用木质纤维素水解液中乙酸资源生产微生物蛋白的研究较少。

本研究旨在评估谷氨酸棒状杆菌利用木质纤维素酸解液的潜力，通过代谢工程手段提升宿主对玉米秸秆酸解液中胁迫因子的耐受性及其对乙酸的利用效率，从而构建能够以酸解液合成外源蛋白的工程菌株。研究将为乙酸资源的生物转化提供参考，并提供一种基于谷氨酸棒状杆菌的低成本、绿色可持续化合物生产方案。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验使用的菌株和质粒见表1。

1.1.2 主要培养基 本研究使用LB培养基培养大肠杆菌，LBHIS培养基用于谷氨酸棒状杆菌的种子培养，NCM培养基用于谷氨酸棒状杆菌感受态制备，3种培养基的配制参照文献[15]。

CGXII合成培养基包括母液、微量元素、$MgSO_4$、$CaCl_2$、生物素、原儿茶酸，分别配制并灭菌，使用前混合。配制方法为：CGXII母液：20 g/L $(NH_4)_2SO_4$、5 g/L尿素、42 g/L 3-吗啉丙磺酸（MOPS）、1 g/L K_2HPO_4、1 g/L KH_2PO_4，KOH调pH至7.0；微量元素储存液（1 000×）：10 g/L $FeSO_4•7H_2O$、10 g/L $MnSO_4•H_2O$、1 g/L $ZnSO_4•7H_2O$、0.313 g/L $CuSO_4•5H_2O$、0.02 g/L $NiCl_2•6H_2O$；$MgSO_4$、$CaCl_2$和生物素储存液（1 000×）：分别为250 g/L $MgSO_4•7H_2O$、13.3 g/L $CaCl_2$、0.2 g/L生物素；原儿茶酸储存液（1 000×）配制：将0.3 g原儿茶酸溶于1 mL NaOH（1 mol/L）中，用ddH_2O补至10 mL，-20 ℃保存备用。

酵母提取物、蛋白胨、脑心浸出液购自美国OXOID公司，无水乙酸钠购自上海泰坦科技股份有限公司，玉米秸秆粉碎物购自河南立泽环保科技有限公司，培养基中的其余药品购自上海国药集团化学试剂公司。

表1　本研究中使用的菌株和质粒

Table 1　Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strains and plasmids	特征 Feature
菌株	
E. coli DH5α	野生型，用于质粒克隆
C. glutamicum ATCC13032	野生型
Evo90	*C. glutamicum* ATCC13032衍生菌株，针对乙酸钠与葡萄糖混合碳源进行适应性实验室进化得到的菌株
Evo90-H36M	Evo90衍生菌株，在Evo90基因组中用H36启动子[15]替换*Mrp1*基因的野生型启动子
质粒	
pXMJ19	*C. glutamicum/E. coli*穿梭载体，氯霉素
pXMJ19-Control	pXMJ19，含有Ptac-RBS-T1-T2表达盒
pXMJ19-*ino-1*	pXMJ19-Control，含有*ino-1*
pXMJ19-*msrA*	pXMJ19-Control，含有*msrA*
pEC-XK99E	大肠杆菌-谷氨酸棒杆菌穿梭质粒，卡那霉素
pEC-Control	pEC-XK99E，含有H36-RBS-T1-T2表达盒
pEC-G1	pEC-Control，含有*ack-pta*基因序列
pEC-G2	pEC-Control，含有*ADY2*基因序列
pEC-G3	pEC-Control，含有*ATO2*基因序列
pEC-G4	pEC-G1，含有RBS-*ADY2*基因序列
pEC-G5	pEC-G1，含有RBS-*ATO2*基因序列
pEC-G2-*mCherry*	pEC-G2，含有RBS、CspB信号肽和*mCherry*基因序列
pEC-G2-*amyE*	pEC-G2，含有RBS、CspB信号肽和*amyE*基因序列
pEC-G2-*VHH*	pEC-G2，含有RBS、CspB信号肽和*VHH*基因序列
pK18mobsacB	*C. glutamicum/E. coli*穿梭载体（ori$V_{E.\ coli}$，*sacB*，*lacZα*，*KanR*）
pK18-H36M	pK18mobsacB包含H36启动子插入同源臂序列

1.1.3　仪器与设备　A300型PCR仪（Applied Biosystem）、MicroPulser型电转化仪（Bio-Rad）、M-100型生物传感器分析仪（Siemens）、LC-20AT型高效液相色谱仪（Shimadzu）、SPARK型酶标仪（Biotek）、EVOL cell型毫升体系微生物适应性进化仪（天木生物）、pH-070A型恒温振荡培养箱（上海知楚），以及Sorvall ST16R型高速低温冷冻离心机（Thermo）。

1.2　*方法*

1.2.1　菌株培养　谷氨酸棒状杆菌野生型及工程菌的种子培养方法为：将冻存菌或转化子于LBHIS平板上划线或涂布于平板上培养24 h，挑取单菌落接种于LBHIS液体培养基，于恒温振荡培养箱培养18 h，用PBS清洗菌体3次，以初始OD_{600}=1.0接种到文中所述的培养基中。其他菌株培养方法参照文献方法[15]。大肠杆菌和谷氨酸棒状杆菌培养过程中用到的氯霉素终浓度分别为30 mg/L和10 mg/L，卡那霉素终浓度分别为50 mg/L和25 mg/L；谷氨酸棒状杆菌培养过程中用到的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）终浓度为1 mmol/L，在接种时添加。

1.2.2　玉米秸秆酸水解液的制备　本研究通过乙酸法制取水解液，具体步骤为：称取50 g的80目玉米秸秆粉碎物，置于玻璃锥形瓶中，按照固液比1∶10（g∶mL）加入500 mL体积分数为20%的乙酸溶液，放入高压蒸汽灭菌锅，120 ℃处理2 h。酸解结束后，将混合物倒入过滤网使固液分离，用50 ℃温水反复冲洗滤渣至洗涤液为无色，收集洗涤液并与滤液混合，得到的溶液定容至2 L即为水解液[16]。为方便对比过程中挥发造成的乙酸损失，按照同样流程对体积分数20%的乙酸溶液进行处理。水解液C和水解液H是将水解液分别与CGXII溶液或ddH_2O按照2∶3的比例进行混合制得，水解液H+是在水解液的基础上添加1 mmol/L $MgSO_4$和0.1 mmol/L $CaCl_2$。

1.2.3 谷氨酸棒状杆菌感受态的制备 谷氨酸棒状杆菌感受态的制备参照文献方法[15]。

1.2.4 谷氨酸棒状杆菌的质粒转化 谷氨酸棒状杆菌通过电穿孔法进行质粒转化，具体操作参照文献方法[15]。

1.2.5 针对乙酸盐与葡萄糖混合碳源的适应性实验室进化 本研究的适应性实验室进化通过毫升体系微生物适应性进化仪EVOL cell（天木生物，无锡）进行。按照1.1.2，分别配制添加了40 g/L葡萄糖与100 g/L乙酸钠的CGXII培养基，分别用A液和B液表示。以*C. glutamicum* ATCC 13032为出发菌株，将种子液以2%的接种量接种到含有8 mL培养基（A液：B液=7：3）的管式生物反应器中，每4 h测定OD_{600}，当连续两次的OD_{600}测定值差值减小时（细胞生长的对数期后期），仪器将以10%的接种量进行传代。当细胞在一个配比的培养基中生长速率有明显提高时，提高B液占比，以此循环。传代结束后，将得到的培养液涂于LBHIS平板过夜培养，挑取单菌落于CGXII+20 g/L葡萄糖+60 g/L乙酸钠的培养基中进行孔板筛选，择取优势菌株以2%接种量接种在CGXII+10 g/L葡萄糖+90 g/L乙酸钠的培养基中进行孔板复筛，择取优势菌株。

1.2.6 分子构建 本研究使用的引物见表2。首先选择本实验室留存的，带有P_{tac}启动子和RBS序列的pXMJ19-Control质粒，以及带有H36启动子（序列参照参考文献[15]）和5′-UTR序列的pEC-Control质粒作为重组蛋白表达的骨架。将*ino-1*（源自*C. glutamicum* ATCC 13032基因组）、*msrA*（源自*C. glutamicum* ATCC 13032基因组）分别克隆到pXMJ19-Control载体上，从而构建了用于表征蛋白功能的质粒pXMJ19-*ino-1*、pXMJ19-*msrA*；将*ack-pta*（源自*C. glutamicum* ATCC 13032基因组）、*ADY2*（源自*Saccharomyces cerevisiae* S288c基因组）、*ATO2*（源自*Saccharomyces cerevisiae* S288c基因组）按照需求组合并克隆到pEC-Control载体上，从而构建了用于表征蛋白功能的pEC-G1至pEC-G5质粒；将CspB信号肽序列（源自*C. glutamicum* BZH001基因组）与*mCherry*、*amyE*（源自*B. subtilis* 168基因组）、*VHH*（源自基因合成）基因组合并克隆到pEC-G2载体上，从而构建了用于表达外源蛋白的pEC-G2-*mCherry*、pEC-G2-*amyE*以及pEC-G2-*VHH*质粒。pK18mobsacB质粒用于*C. glutamicum*中的基因插入。质粒构建都采用无缝克隆试剂盒。

1.2.7 蛋白的荧光强度检测及SDS-PAGE分析 发酵过程中，在特定时刻取样至无菌离心管中，样品或稀释后的样品经过6 000 r/min离心5 min，取上清进行蛋白的荧光强度检测和SDS-PAGE。对于mCherry的荧光测定，取200 μL发酵液上清，于酶标仪测量荧光值（Fluorescence Polarizatio，FP，激发波长570 nm；发射波长615 nm）。SDS-PAGE分析参照文献[15]。

1.2.8 分析方法 使用759S紫外可见分光光度计（棱光，上海）测定细胞密度OD_{600}；使用M-100生物传感器分析仪（西尔曼科技，深圳）测定葡萄糖含量；使用DNS法测定还原糖含量，将DNS试剂与待测样本1：1（v/v）混合后煮沸5 min，在540 nm处检测吸光值；使用LC-20AT高效液相色谱仪（岛津，日本）及Aminex HPX-87H离子交换柱（伯乐，美国）测定乙酸含量，流动相为5 mmol/L H_2SO_4，流速为0.6 mL/min，柱温40 ℃，通过RID-20A检测器（岛津，日本）在210 nm处分析。

2 结果

2.1 谷氨酸棒状杆菌对玉米秸秆酸解液碳源的利用情况

本研究制备的酸解液中葡萄糖浓度为（0.8±0.2）g/L，总还原糖低于3.0 g/L，乙酸浓度为（70±10）g/L，pH为2.86。对照组乙酸浓度为（47±12）g/L，表明约33%的乙酸来自秸秆水解。

为了探究野生型菌株（WT）对酸解液的利用情况，将WT菌株分别接种于含0.32 g/L葡萄糖和28 g/L乙酸盐，pH约为6.0的3种培养基中培养（图1-A，B）。在CGXII+混合碳源培养基中，WT生长正常，葡萄糖和乙酸盐分别于12 h和24 h内消耗完毕。在水解液C中，WT在培养48 h内未观察到生长及碳源消耗，但培养至84 h时，其生物量与CGXII+混合碳源组相当且碳源已耗尽（数据未显示）。而在水解液H中，WT仅在培养初期有微弱生长，随后生长停滞且未消耗碳源；培养84 h后培养液澄清，瓶底可见细胞裂解残留物，表明细胞死亡。此外，由于所用菌株不具备木糖利用能力（图1-C），这排除了水解液中可能存在的木糖对生长结果的干扰。

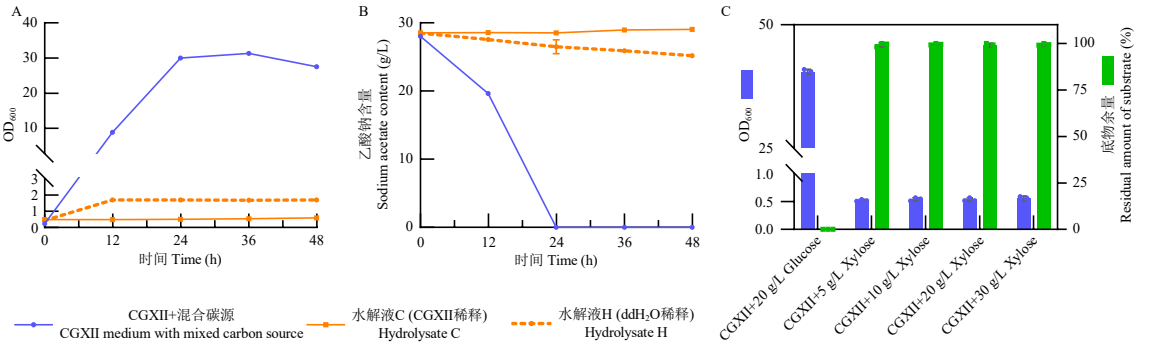
表2　本研究中使用的引物

Table 2　Primers used in this study

引物名称 Primers	序列 Sequence (5′–3′)	用途 Description
pXMJ19-F	GGATCCCCGGGTACC	pXMJ19-Control载体线性化
pXMJ19-R	TCCTGGAGAGTCGACCTG	
ino-F	GTCGACTCTCCAGGAGGACATACAATGAGCACGTCCACCA	构建pXMJ19-*ino-1*质粒
ino-R	GGTACCCGGGGATCCTTACGCCTCGATGATGAATG	
msrA-F	GTCGACTCTCCAGGAGGACATACAATGGCATGGTTTTTCGCA	构建pXMJ19-*msrA*质粒
msrA-R	GGTACCCGGGGATCCTTAAGCTTCTACCCCGCAC	
99k-F	CCATGCGAGAGTAGGGAACTGC	pEC-Control载体线性化
99k-R	TTTTTTTCCTCCTTTTCTCGAGG	
Ack-F	AAAGGAGGAAAAAAAATGAGCGCCGAACTCTTTG	构建pEC-G1质粒
Ack-R	CCTACTCTCGCATGGTTAAGCGAACTTCACCGCGTA	
ADY-F	AAAGGAGGAAAAAAAATGTCTGACAAGGAACAAACGAGC	构建pEC-G2质粒
ADY-R	CCTACTCTCGCATGGTTAAAAGATTACCCTTTCAGTAGATGGTAATGGG	
ATO-F	AAAGGAGGAAAAAAAATGTCTGACAGAGAACAAAGCAG	构建pEC-G3质粒
ATO-R	CCTACTCTCGCATGGTTAGAAGAACACCTTATCATTGCTAGGT	
1229-HR-ack-F	CCATGCGAGAGTAGGGAACTG	pEC-G1载体线性化
1229-HR-ack-R	TTAAGCGAACTTCACCGCGTACC	
1229-ADY-F	GTGAAGTTCGCTTAACCAGGAGGACATACACTAATGTCTGACAAGGAACAAACG	构建pEC-G4质粒
1229-ADY-R	CCTACTCTCGCATGGTTAAAAGATTACCCTTTCAGTAGATGGTAATGGG	
1229-ATO-F	GTGAAGTTCGCTTAACCAGGAGGACATACACTAATGTCTGACAGAGAACAAAG	构建pEC-G5质粒
1229-ATO-R	CCTACTCTCGCATGGTTAGAAGAACACCTTATCATTGCTAGGTAATGC	
HR-99k-ADY-F	CCATGCGAGAGTAGGGAACTGC	pEC-G2载体线性化
HR-99k-ADY-R	TGTATGTCCTCCTGGTAAAAGATTACCCTTTCAGTAGATGGTAATGGG	
CspB-F	CCAGGAGGACATACAATGTTTAACAATCGTATCCGC	扩增CspB片段
CspB-R	TTCCTGAGCGAATGCTG	
1115-mChe-F	GCATTCGCTCAGGAAGTGAGCAAGGGCGAGGAG	构建pEC-G2-*mCherry*质粒
1115-mChe-R	CCTACTCTCGCATGGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC	
1115-AL-F	GCATTCGCTCAGGAAGAAACGGCGAACAAATCGA	构建pEC-G2-*amyE*质粒
1115-AL-R	CCTACTCTCGCATGGTTAATGGGGAAGAGAACCGC	
1115-VHH-F	GCATTCGCTCAGGAACAGGTCCAACTGCAAGAAAGC	构建pEC-G2-*VHH*质粒
1115-VHH-R	CCTACTCTCGCATGGTTATGAAGAGACGGTCACCTGGG	
Mrp1-1-F	CATGATTACGAATTCCGTAGTTGATCGAGTTGGTC	构建pK18-H36M质粒，Mrp1启动子替换的上游同源臂
Mrp1-1-R	CTGGGCCCGTTAATAGCTAAACCTCGAAACAATAAC	
Mrp1-2-F	GTAGCATGGGATCCAAGGAGGAAAAAAAATGAGTTTGCTATTTGTTGTGGCGCTTGC	构建pK18-H36M质粒，Mrp1启动子替换的下游同源臂
Mrp1-2-R	GTGCCAAGCTTGCATTACCCATGCCGACGATAATCAGC	
H36-F	TATTAACGGGCCCAGGGTGG	构建pK18-H36M质粒，扩增H36片段
H36-R	TTTTTTTCCTCCTTGGATCCCATGCTACTCCTACC	

2.2　添加额外成分与过表达抗氧化应激基因实现水解液利用

为实现菌株对木质纤维素水解液的高效利用，本研究通过筛选可促进水解液利用的外源添加成分，并结合抗氧化应激相关基因的过表达，以改善菌株在水解液环境中的生长性能。如图2-A所示，向水



A，B：WT在不同培养基中的生长及底物消耗情况；C：WT在含有不同碳源的CGXII培养基中培养不同时长（葡萄糖组与木糖组分别在24 h与120 h取样）的细胞密度与底物余量

A, B: Growth and substrate consumption of the wild-type (WT) strain in different medium. C: Cell density and residual substrate of the WT strain cultivated in CGXII medium containing different carbon sources for varied durations (samples were taken at 24 h for the glucose group and at 120 h for the xylose group)

图1 野生型菌株WT在水解液中的生长情况

Fig. 1 Growth of the wild-type strain WT in hydrolysate

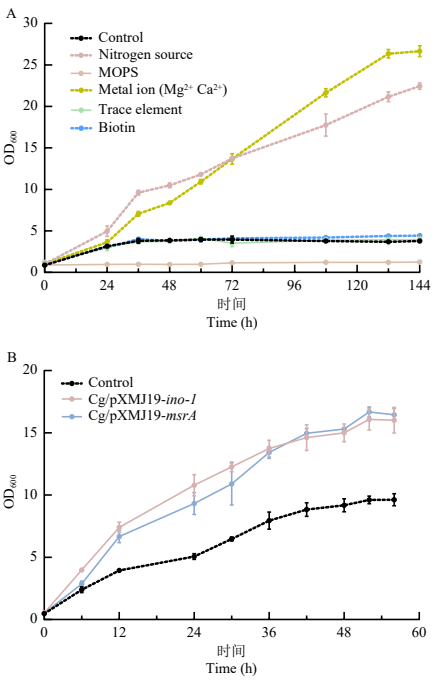
解液H中分别添加氮源（$(NH_4)_2SO_4$、尿素）、缓冲剂（MOPS）、金属离子（Mg^{2+}、Ca^{2+}）、微量元素或生物素后，WT菌株仅在添加氮源或金属离子时能够持续生长；添加MOPS则完全抑制生长；其余组别仅在培养初期呈现微弱生长。

如图2-B所示，对比了过表达抗氧化基因*ino-1*或*msrA*后菌株在水解液H+中的生长情况。结果显示，工程菌Cg/pXMJ19-*ino-1*与Cg/pXMJ19-*msrA*的最大OD_{600}分别为16.07±0.70、16.67±0.32，相较于对照组（9.63±0.39）分别提高66.98%和73.18%，其中*ino-1*的作用略优于*msrA*。

2.3 通过适应性实验室进化提高菌株的乙酸耐受性

为了探究菌株利用不同浓度乙酸盐的生长情况，检测了WT菌株在以40 g/L葡萄糖或不同浓度乙酸钠（18.2、36.4、54.6、72.8 g/L）为唯一碳源的CGXII培养基中的生长性能（图3-A）发现，菌株生长的迟滞期随着乙酸盐浓度升高而延长，细胞对高浓度乙酸盐的耐受性差。

因此通过适应性实验室进化提高菌株对乙酸的耐受性，如图3-B所示，以*C. glutamicum* ATCC 13032菌株为出发菌株，经过29次连续传代后，获得一株可在CGXII+4 g/L葡萄糖+90 g/L乙酸钠培养基中稳定生长的进化菌株，命名为Evo90。相比于WT，Evo90在CGXII+0.8 g/L葡萄糖+70 g/L乙酸钠培养基中生长得到明显改善（图3-C）。对菌株Evo90



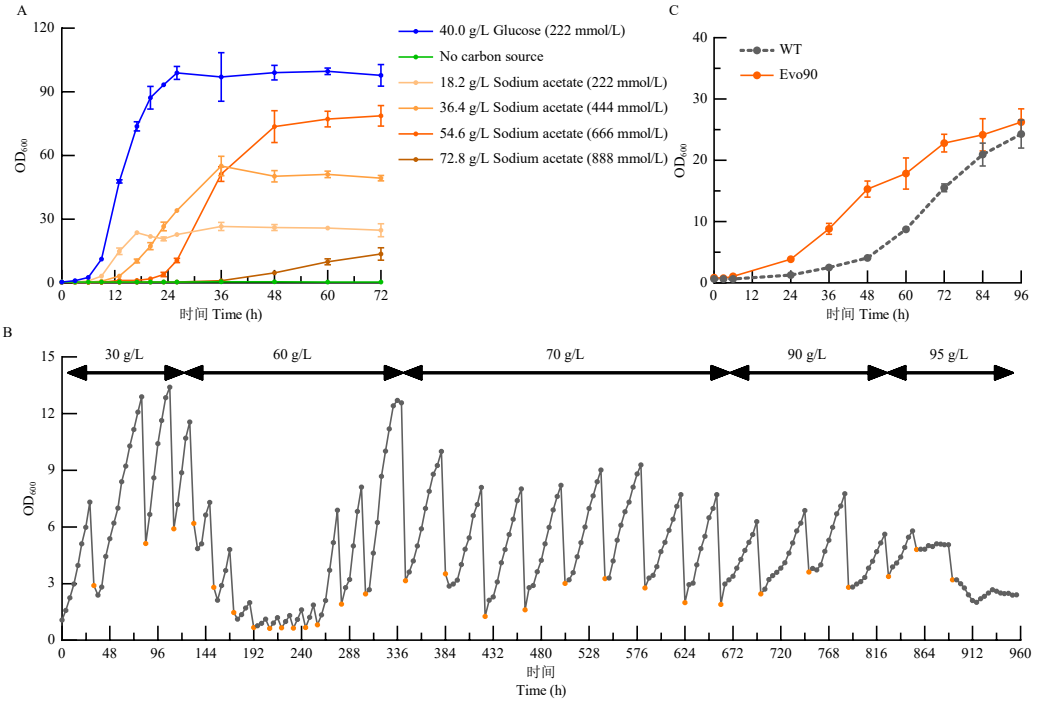
A：WT在添加不同成分的水解液H中的生长情况；B：工程菌Cg/pXMJ19-*ino-1*与Cg/pXMJ19-*msrA*在水解液H+中生长情况

A: Growth of the wild-type (WT) strain in hydrolysate H supplemented with different components. B: Growth of engineered strains Cg/pXMJ19-*ino-1* and Cg/pXMJ19-*msrA* in hydrolysate H+

图2 关键成分与抗氧化基因的筛选

Fig. 2 Screening of key ingredients and antioxidant genes

及WT进行全基因组重测序（金唯智，苏州），与已发表的*C. glutamicum* ATCC 13032基因组序列（Gen-



A：WT在添加不同碳源的CGXII培养基中的生长情况；B：传代培养过程中细胞生长情况；C：Evo90与WT的生长对比

A: Growth of the wild-type (WT) strain in CGXII medium supplemented with different carbon sources. B: Cell growth during serial subculturing. C: Growth comparison between Evo90 and the WT strain

图3　适应性实验室进化及进化菌株Evo90性能验证

Fig. 3　Adaptive laboratory evolution and performance validation of the evolved strain Evo90

Bank：BA000036.3）比对，结果显示二者的变异相同，表明经过传代培养后细胞并未发生新的遗传变异（表3）。

2.4　过表达相关基因增强菌株的乙酸利用

为改善菌株在乙酸胁迫下的细胞生长性能，本研究对乙酸代谢相关基因进行过表达改造。如图4-A所示，通过替换H36启动子在基因组层面对*mrp1*基因进行过表达，工程菌Evo90-H36M与Evo90在CGXII+0.8 g/L葡萄糖+70 g/L乙酸钠培养基中培养64 h的OD_{600}分别为43.65±0.98和36.96±0.68，最大细胞密度提升约18.11%。

对*ack-pta*、*ADY2*、*ATO2*进行组合过表达（图4-B），仅Evo90-H36M/pEC-G2在CGXII+0.8 g/L葡萄糖+70 g/L乙酸钠培养基中的生长得到了改善（图4-C）。如图4-D所示，将以上改造集成于Evo90-H36M菌株，相较于对照组Cg/pEC-Control/pXMJ19-Control经过60 h生长到稳定期，优势菌Evo90-H36M/pEC-G2/pXMJ19-*ino-1*的迟滞期极短，在36 h即可达到最大生物量，达到稳定期的时间缩短约40%。

2.5　工程菌利用水解液分泌表达外源蛋白

为探究菌株利用酸解液表达外源蛋白的可行性，本研究选择mCherry、α-淀粉酶、VHH蛋白作为模式蛋白开展验证。如图5-A所示，3种工程菌在发酵24 h时的OD_{600}值都在9.02±0.44范围内；SDS-PAGE分析分别在29 kD（mCherry）、72 kD（α-淀粉酶）、18 kD（VHH）观察到与预期分子量一致的特异性条带，表示3种目标蛋白均成功表达。对发酵48 h内的发酵上清液荧光检测结果如图5-B所示，利用水解液H+的实验组最大荧光强度（9 395±453）高于CGXII+35 g/L葡萄糖组（8 503±420），是CGXII+50 g/L葡萄糖组（16 994±586）的55.3%左右。尽管在水解液H+中菌体最终生物量偏低（最大OD_{600}为16.16±0.27），但其单位OD_{600}的荧光强度更高（图5-C），发酵12 h时荧光强度可达50 g/L葡萄糖对照组的10.18倍（水解液H+为1 463±69，CGXII+50 g/L葡萄糖为144±2）。

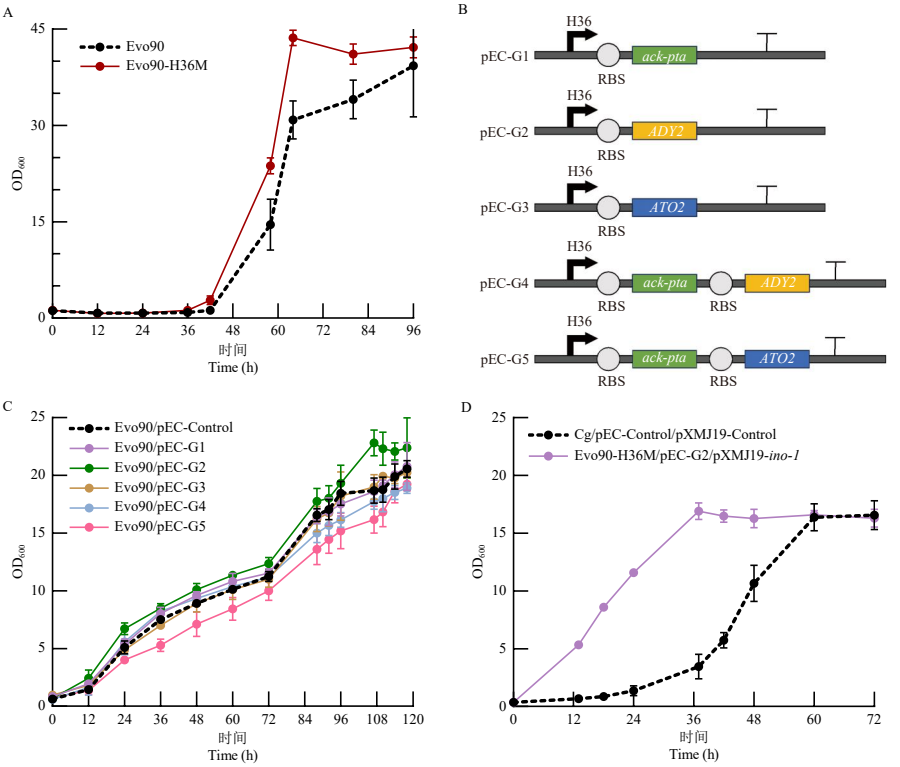
表3 Evo90与WT样品全基因组重测序结果

Table 3 Whole-genome resequencing results of Evo90 and WT

类型 Type	位点 Site	突变 Mutation	氨基酸变化 Change of amino acid	基因 Gene	蛋白名称 Protein
单碱基突变	32141	C→T	–	*Cgl0031*	ABC-type transporter, permease components
	274977	T→C	–	*Cgl0255*	Catalase
	364652	A→G	K→E	*Cgl0344*	ATPases involved in chromosome partitioning
	364912	A→C	E→D	*Cgl0344*	ATPases involved in chromosome partitioning
	387460	T→C	–	*Cgl0365*	Hypothetical protein
	736480	T→C	V→A	*Cgl0716*	Hypothetical protein
	770809	G→A	L→F	*Cgl0738*	Type II restriction enzyme, methylase subunits
	1279070	T→G	D→E	*Cgl1212*	F0F1-type ATP synthase beta subunit
	1751737	G→A	V→I	*Cgl1651*	Hypothetical protein
	2036724	A→C	–	*Cgl1928*	Predicted transcriptional regulator, consists of a Zn-ribbon and ATP-cone domains
	2041951	G→T	G→V	*Cgl1934*	Transcriptional regulators of sugar metabolism
	2058943	A→G	S→P	*Cgl1949*	2-methylthioadenine synthetase
	2060507	C→T	–	*Cgl1951*	ABC-type transporter, periplasmic component (glutamate)
	2083859	T→A	–	*Cgl1975*	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase (polynucleotide phosphorylase)
	2160737	C→T	P→L	*Cgl2047*	Hypothetical protein
	2425773	G→A	–	*Cgl2457*	Alkaline phosphatase
	2602951	C→T	–	*Cgl2460*	ABC-type transporter, permease components
	2605561	C→T	–	*Cgl2505*	Hypothetical membrane protein
	2655586	C→T	A→T	*Cgl2575*	ABC-type transporter, periplasmic component
	2737632	T→C	–	*Cgl2587*	Predicted membrane proteins, hemolysin III homologs
	3156189	T→G	–	*Cgl3077*	Hypothetical membrane protein
	3286754	G→A	–	*Cgl0344*	ATPases involved in chromosome partitioning
碱基缺失	364006	G→–	–	*Cgl0657*	Uncharacterized protein involved in propionate catabolism
	671706	A→–	–	*Cgl1992*	ABC-type transporter, permease components
	2296630	C→–	–	*Cgl2457*	Alkaline phosphatase
碱基插入	2103241	GGCCCTTCCGGTTTTGGGGTACATCACAGAACCTGGGCTAGCGGTGTAGACCCGAAAATAAACGAGCCTT	–	*Cgl2168*	Hypothetical membrane protein

3 讨论

酸解法在木质纤维素的降解中具有成本低、易操作的优势，农业残余物经过酸解得到的水解液中含有高浓度乙酸盐、少量可发酵糖以及毒性物质。通过物理、化学或生物法进行脱毒处理可以减轻胁迫物质对细胞的伤害，但这往往意味着更高的成本[2, 6]。因此，通过耐受性强的微生物直接利用水解液合成化学品是一种经济的解决方案。谷氨酸棒状杆菌可以乙酸为唯一碳源生长并生产蛋白[10-11]，已被用于以乙酸盐为底物合成衣康酸等化学品[12-13]。然而，针对该菌直接利用木质纤维素水解液中乙酸资源的研究仍较缺乏。本研究以玉米秸秆乙酸法水解液为底物，探究谷氨酸棒状杆菌对该来源中乙酸资源的利用能力。



A：Evo90-H36M与Evo90的生长情况对比；B：pEC-G1–pEC-G5质粒构建示意图；C：Evo90/pEC-G1–pEC-G5的生长情况对比；D：优势菌与对照组的生长情况对比

A: Growth comparison between Evo90-H36M and Evo90. B: Schematic diagram of the construction of pEC-G1 to pEC-G5 plasmids. C: Growth comparison of Evo90/pEC-G1 to G5. D: Growth comparison between the superior strain and the control

图4　过表达乙酸利用相关基因的结果

Fig. 4　Results of overexpression of acetic acid utilization-related genes

本研究制备的酸解液中乙酸浓度达70 g/L（约33%来自秸秆水解），葡萄糖约0.8 g/L，戊糖含量较低（<2.2 g/L），可能与水解过程中戊糖降解有关[5]。前期实验表明，*C. glutamicum* ATCC 13032野生型（WT）在添加70 g/L乙酸钠的培养基中生长明显受到抑制，而在18.2–36.4 g/L范围内生长较好，因此选用28 g/L乙酸钠的浓度作为后续实验条件。在探究WT对水解液的利用时发现，向水解液中添加氮源或1 mmol/L $MgSO_4$与0.1 mmol/L $CaCl_2$即可实现菌株直接利用水解液生长。谷氨酸棒状杆菌利用乙酸为碳源进行生长与发酵时，碳氮比（C/N）会影响细胞生物量与蛋白产量的积累[17–18]。玉米秸秆水解液中氮元素含量较低[16]，但相比添加g/L级别的氮源，补充少量的Mg^{2+}与Ca^{2+}是更经济的策略。Mg^{2+}参与多种酶促反应及代谢调控，其缺乏可能影响碳源利用偏好[19–22]；Ca^{2+}则作为信号分子与细胞功能及死亡密切相关[23]。水解液中的醛类与酚类化合物会诱导胞内活性氧（ROS）积累，引起氧化应激与细胞损伤[6, 24]。谷氨酸棒状杆菌中的肌醇-3-磷酸合酶Ino-1与甲硫氨酸亚砜还原酶MsrA可通过不同机制降低ROS水平，促进细胞在胁迫下的生长[24–25]。研究结果证实，这两种酶均有助于菌株适应水解液环境。基于上述优化，初步实现了工程菌对水解液的直接利用。

为了提高菌株对高浓度乙酸的耐受与利用能力，首先通过适应性实验室进化，获得了性能显著提升的菌株Evo90。全基因组测序未检测到新的遗传变异，但进化过程中菌液黏度逐渐下降，可能是由于胞外多糖分泌减少或细胞壁成分（如肽聚糖、磷壁酸）发生改变[26–28]，表明其性能改善可能源于转录组水平的适应性调控。我们对Evo90菌株在以葡萄糖为碳源的培养基中进行了约5次传代，其在高

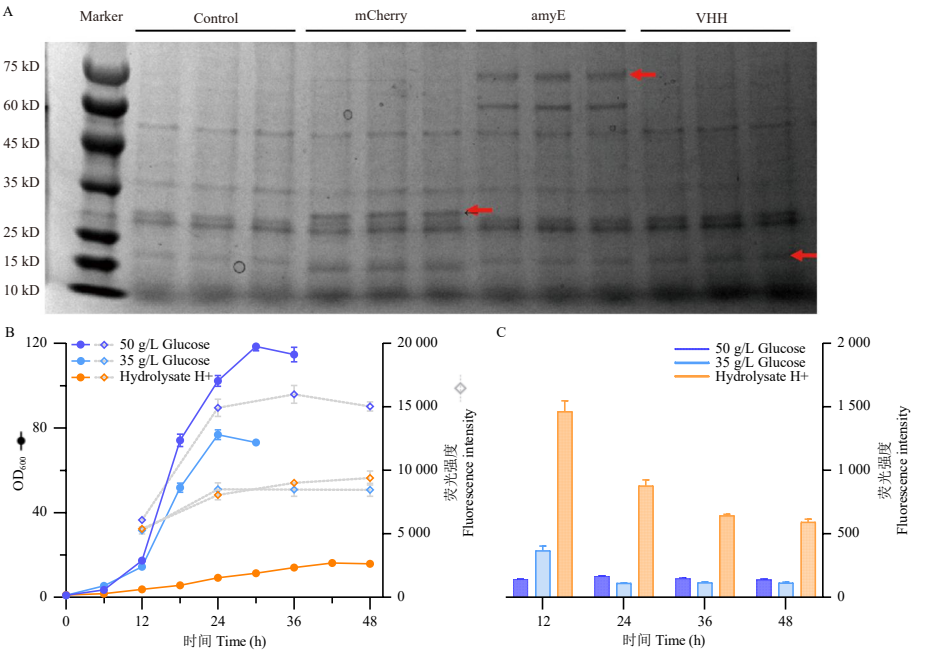


图5 工程菌分泌表达蛋白的SDS-PAGE分析(A)与胞外荧光强度(B和C)

Fig. 5 SDS-PAGE (A) and the extracellular fluorescence intensity analysis (B and C) of secreted expressed proteins by the engineered strain

浓度乙酸盐中的生长优势依旧存在，但这种转录组水平的改变无法保证菌株的遗传稳定性，所以适应性进化对于改善细胞生长是有效的，但需要提高选择压力和延长传代培养时间。进一步考察了多个与乙酸代谢相关的基因：谷氨酸棒状杆菌内源的反向转运蛋白Mrp1，它在赋予环境Na^+抗性起着至关重要的作用[29]；乙酸激酶（ACK）与磷酸转乙酰酶（PTA）是内源催化乙酸同化第一步反应的酶；以及来自酿酒酵母的二联体蛋白ADY2与氨外排蛋白ATO2，它们被证明在乙酸根的转运中起作用[30-31]。过表达结果显示，Mrp1与ADY2能促进乙酸利用，而过表达*ack*与*pta*基因反而抑制菌株生长，可能与PTA的反向催化导致乙酰磷酸积累有关[32]。

结合*ino-1*、*mrp1*与*ADY2*基因的过表达，从耐受和利用两个方面改善了工程菌在水解液中的生长，但相比于在含有28 g/L乙酸钠的水解液H中的情况，工程菌利用水解液能够达到的最大细胞密度很低，这可能来源于外源基因表达带来的“代谢压力”或培养基碳氮比、离子浓度等，具体原因需要进一步探究。进而成功利用水解液表达了模式蛋白mCherry、来源于枯草芽胞杆菌168的α-淀粉酶（AmyE）及骆驼抗体片段（VHH），验证了工程菌以水解液生产外源蛋白的可行性（各组在18 kD均有浅条带，是菌株内源蛋白干扰，这与本实验室之前的研究一致[33]）。发酵实验表明，工程菌利用本研究制备的酸解液合成的蛋白产量与在CGXII+35 g/L葡萄糖合成培养基中相当。尽管在水解液中培养的细胞密度较低，但其单位OD_{600}的蛋白产量更高，这可能得益于乙酸可以更有效地通过乙酰辅酶A进入代谢途径[34-36]。因此，通过代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌转化酸解液中的乙酸，有望成为微生物蛋白生产的低成本替代方案。

综上，本研究通过离子营养调控、抗氧化胁迫改造以及乙酸代谢通量强化的菌株改造策略，实现了谷氨酸棒状杆菌对玉米秸秆酸解液的直接资源化利用，证实木质纤维素酸解液可替代传统碳源用于功能蛋白异源合成，为农业废弃物低成本制备异源功能蛋白提供了新思路。然而，现阶段工程菌尚无法完全利用酸解液中的乙酸，这可能与酸解液中的碳氮比或Ca^{2+}、Mg^{2+}浓度及复杂抑制物协同作用等因

素有关。后续可进一步解析菌株酸解液胁迫响应与乙酸代谢的分子调控网络，优化培养基离子与营养配比、多基因协同改造代谢通路，实现酸解液乙酸底物的完全利用与异源蛋白合成效率的进一步提升，推动木质纤维素废弃物生物炼制技术的实际工程化应用。

4　结论

以玉米秸秆酸解液为研究对象，通过外源添加氮源或Mg^{2+}、Ca^{2+}的策略，可低成本实现谷氨酸棒状杆菌在水解液中的直接生长。过表达抗氧化基因*ino-1*、*msrA*可缓解酸解液诱导的氧化应激，结合适应性实验室进化以及反向转运蛋白基因*mrp1*和二联体蛋白基因*ADY2*的过表达，显著提升了菌株对乙酸的耐受与利用效率，使菌株进入生长稳定期的时长缩短约40%。改造后的工程菌可以利用酸解液高效表达异源蛋白，且单位细胞蛋白合成效率高于葡萄糖对照组。

参考文献

[1] Gu PF, Li FF, Huang ZS, et al. Application of acetate as a substrate for the production of value-added chemicals in *Escherichia coli* [J]. Microorganisms, 2024, 12(2): 309.

[2] Taha M, Foda M, Shahsavari E, et al. Commercial feasibility of lignocellulose biodegradation: possibilities and challenges [J]. Curr Opin Biotechnol, 2016, 38: 190-197.

[3] Yang H, Huang B, Lai NY, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* carrying the hybrid acetone-biosynthesis pathway for efficient acetone biosynthesis from acetate [J]. Microb Cell Fact, 2019, 18: 6.

[4] Woo HM, Park JB. Recent progress in development of synthetic biology platforms and metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* [J]. J Biotechnol, 2014, 180: 43-51.

[5] Filina A, Jemaa N, Saulnier-Bellemare T, et al. Techno-economic analysis (TEA) and life-cycle assessment (LCA) methodology as a tool for biorefining technology benchmarking and iterative process design [J]. Biomass Bioenergy, 2026, 204: 108390.

[6] 程怡雯. 木质纤维素水解液中主要抑制物分析及*Candida* glycerinogenes抗性基因挖掘应用 [D]. 无锡: 江南大学, 2025.
Cheng YW. Analysis of main inhibitors in lignocellulose hydrolysate and application of *Candida* glycerinogenes resistance gene mining [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2025.

[7] Pinhal S, Ropers D, Geiselmann J, et al. Acetate metabolism and the inhibition of bacterial growth by acetate [J]. J Bacteriol, 2019, 201(13): 1-166.

[8] Zhang YW, Yang JJ, Qian FH, et al. Engineering a xylose fermenting yeast for lignocellulosic ethanol production [J]. Nat Chem Biol, 2025, 21(3): 443-450.

[9] Gerstmeir R, Wendisch VF, Schnicke S, et al. Acetate metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum* [J]. J Biotechnol, 2003, 104(1/2/3): 99-122.

[10] Kiefer D, Merkel M, Lilge L, et al. High cell density cultivation of *Corynebacterium glutamicum* on bio-based lignocellulosic acetate using pH-coupled online feeding control [J]. Bioresour Technol, 2021, 340: 125666.

[11] Kiefer D, Tadele LR, Lilge L, et al. High-level recombinant protein production with *Corynebacterium glutamicum* using acetate as carbon source [J]. Microb Biotechnol, 2022, 15(11): 2744-2757.

[12] Shi XY, Chang J, Kim M, et al. Isopropanol production using engineered *Corynebacterium glutamicum* from waste rice straw biomass [J]. Bioresour Technol, 2024, 396: 130416.

[13] Schmollack M, Werner F, Huber J, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for acetate-based itaconic acid production [J]. Biotechnol Biofuels, 2022, 15: 139.

[14] Lee DS, Cho EJ, Nguyen DT, et al. Succinic acid production from softwood with genome-edited *Corynebacterium glutamicum* using the CRISPR-Cpf1 system [J]. Biotechnol J, 2024, 19: 2300309.

[15] Zou Y, Fan ZM, Liu XX, et al. Engineering MtrAB two-component system enhances protein and glutamate export in *Corynebacterium glutamicum* through cell wall remodeling [J]. Bioresour Technol, 2025, 436: 133024.

[16] 尚进, 平清伟, 盛雪茹, 等. 玉米秸秆乙酸法水解液对盐碱土的改良效果研究 [J]. 中国造纸学报, 2025, 40(2): 17-25.
Shang J, Ping QW, Sheng XR, et al. Study on the effect of acetic acid hydrolysate of corn stalk on the improvement of saline-sodic soil [J]. Trans China Pulp Pap, 2025, 40(2): 17-25.

[17] Chen Z, Chen XJ, Li QY, et al. Transcriptome analysis reveals potential mechanisms of L-serine production by *Escherichia coli* fermentation in different carbon-nitrogen ratio medium [J]. Foods, 2022, 11(14): 2092.

[18] Merkel M, Kiefer D, Schmollack M, et al. Acetate-based production of itaconic acid with *Corynebacterium glutamicum* using an integrated pH-coupled feeding control [J]. Bioresour Technol, 2022, 351: 126994.

[19] Guo TF, Herman JK. Magnesium modulates *Bacillus subtilis* cell division frequency [J]. J Bacteriol, 2023, 205: e00375-e00322.

[20] Groisman EA. The ins and outs of virulence gene expression: Mg^{2+} as a regulatory signal [J]. BioEssays, 1998, 20(1): 96-101.

[21] Kröse JL, de Baaij JHF. Magnesium biology [J]. Nephrol Dial Transplant, 2024, 39(12): 1965-1975.

[22] Pokorzynski ND, Jones KA, Campagna SR, et al. Cytoplasmic Mg^{2+} supersedes carbon source preference to dictate *Salmonella*

metabolism [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2025, 122(13): e2424337122.

[23] Pinton P, Romagnoli A, Rizzuto R, et al. Ca^{2+} signaling, mitochondria and cell death [J]. Curr Mol Med, 2008, 8(2): 119-130.

[24] Chen C, Chen KQ, Su T, et al. *Myo*-inositol-1-phosphate synthase (Ino-1) functions as a protection mechanism in *Corynebacterium glutamicum* under oxidative stress [J]. MicrobiologyOpen, 2019, 8 (5): e00721.

[25] Si MR, Zhang L, Chaudhry MT, et al. *Corynebacterium glutamicum* methionine sulfoxide reductase a uses both mycoredoxin and thioredoxin for regeneration and oxidative stress resistance [J]. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(8): 2781-2796.

[26] Wang Y, Hu LT, Huang H, et al. Eliminating the capsule-like layer to promote glucose uptake for hyaluronan production by engineered *Corynebacterium glutamicum* [J]. Nat Commun, 2020, 11: 3120.

[27] Mengi B, Ikeda S, Murayama D, et al. Factors affecting decreasing viscosity of the culture medium during the stationary growth phase of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus fermentum* MTCC 25067 [J]. Biosci Microbiota Food Health, 2020, 39(3): 160-168.

[28] Jiang XY, Whitehead KA, Arneborg N, et al. Understanding bacterial surface and adhesion properties and the implications for Pickering stabilization of colloidal structures [J]. Curr Opin Colloid Interface Sci, 2024, 69: 101767.

[29] Xu N, Zheng YY, Wang XC, et al. The lysine 299 residue endows the multisubunit Mrp1 antiporter with dominant roles in Na^{+} resistance and pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Appl Environ Microbiol, 2018, 84(10): e00110-e00118.

[30] Mutyala S, Kim JR. Recent advances and challenges in the bioconversion of acetate to value-added chemicals [J]. Bioresour Technol, 2022, 364: 128064.

[31] Ribas D, Soares-Silva I, Vieira D, et al. The acetate uptake transporter family motif "NPAPLGL(M/S)" is essential for substrate uptake [J]. Fungal Genet Biol, 2019, 122: 1-10.

[32] Song P, Ma N, Dong SK, et al. Enhancing acetate utilization in *Phaeodactylum tricornutum* through the introduction of acetate transport protein [J]. Biomolecules, 2024, 14(7): 822.

[33] Liu XX, Li GY, Cui SN, et al. Combinatorial tuning of 5′UTR and N-terminal coding sequences for enhanced recombinant protein expression in *Corynebacterium glutamicum* [J]. ACS Synth Biol, 2025, 14(8): 3105-3115.

[34] Cai WF, Wang XF, Zhu Z, et al. Synergetic effects in the co-pyrolysis of lignocellulosic biomass and plastic waste for renewable fuels and chemicals [J]. Fuel, 2023, 353: 129210.

[35] Claes WA, Pühler A, Kalinowski J. Identification of two *prpDBC* gene clusters in *Corynebacterium glutamicum* and their involvement in propionate degradation via the 2-methylcitrate cycle [J]. J Bacteriol, 2002, 184(10): 2728-2739.

[36] Watanabe A, Hiraga K, Suda M, et al. Functional characterization of *Corynebacterium alkanolyticum* β-xylosidase and xyloside ABC transporter in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(12): 4173-4183.

（责任编辑　朱琳峰）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):309-317

基于Rep蛋白定向进化与高通量筛选提高rAAV产量

宋紫川[1,2] 任和[1,2] 莫婉婷[1,2] 聂简琪[1,2] 白仲虎[1,2,3*]

（1.江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室,无锡 214000; 2.江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室,无锡 214000; 3.郑州技术工程学院,郑州 450000）

摘 要： 【目的】对Rep蛋白编码基因进行随机突变，构建突变体文库并建立高通量筛选平台，以获得可提高rAAV产量的Rep蛋白突变体，并解析其作用机制。【方法】采用易错PCR构建Rep蛋白突变文库。利用带挡板24孔深孔板培养HEK293细胞并进行三质粒转染，以rAAV基因组滴度为指标，将产量接近或高于对照组80%的培养孔定义为候选突变组。对候选组中Rep蛋白突变体进行摇瓶复验，获得Rep蛋白有益突变体。通过分析*rep*基因和*cap*基因转录、Rep蛋白和Cap蛋白表达、rAAV转导效率，并基于AlphaFold3预测Rep78蛋白结构以及突变位点定位，解析突变体rAAV产量提高机制。【结果】基于高通量筛选与摇瓶验证获得2个Rep蛋白有益突变体P39L与Q202H，其rAAV产量分别提高至对照组的2.0倍与1.8倍。对Rep蛋白的P39位点与Q202位点进行饱和突变未进一步提高rAAV产量。进一步分析表明，Rep蛋白突变体P39L和Q202H未显著影响Rep蛋白与Cap蛋白的表达量及rAAV的转导效率。结构定位结果表明，P39位于起源结构域（origin-binding domain，OBD）区域，Q202位于OBD与同源异型结构域（homeodomain，HD）的过渡区域且靠近OBD。【结论】建立了Rep蛋白定向进化与高通量筛选技术，获得了可将rAAV产量分别提高至对照组的2.02倍和1.87倍的Rep蛋白有益突变体P39L和Q202H。OBD及其邻近区域是影响rAAV产量的重要敏感区域。

关键词： 重组腺相关病毒；Rep蛋白；随机突变；高通量筛选；病毒产量

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0320

Enhancing rAAV Production through Directed Evolution and High-throughput Screening of Rep Protein

SONG Zi-chuan[1,2] REN He[1,2] MO Wan-ting[1,2] NIE Jian-qi[1,2] BAI Zhong-hu[1,2,3*]

（1. *Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi* 214000; 2. *National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi* 214000; 3. *Zhengzhou University of Technology, Zhengzhou* 450000）

Abstract: 【Objective】 This study aimed to perform random mutagenesis of the Rep-coding gene, construct a mutant library, and establish a high-throughput screening platform for the identification of Rep variants capable of enhancing rAAV production, and then elucidate their mechanism of action. 【Method】 A Rep mutant library was constructed by error-prone PCR. HEK293 cells cultured in baffled 24-well deep-well plates were subjected to triple-plasmid transfection. Using rAAV genome titer as the screening criterion, culture wells with yields close to or exceeding 80% of the control group were selected as candidate mutant groups. Rep mutants from candidate groups were further validated in shake-flask cultures to obtain beneficial Rep variants. The underlying mechanisms of the enhanced rAAV production were investigated by analyzing *rep/cap* gene transcription, Rep/Cap protein expression, and rAAV transduction efficiency, as well as by predicting the Rep78 structure using AlphaFold3 and locating the mutation sites. 【Result】 Through high-throughput screening and shake-flask verification, we identified two beneficial Rep protein mutants, P39L and Q202H, which enhanced rAAV yield to 2.02-fold and 1.87-fold that of the control, respectively. Saturation mutagenesis at positions P39 and Q202 of the Rep protein did not further improve rAAV yield. Further analysis indicated that P39L and Q202H did not significantly affect Rep/Cap expression levels or rAAV transduction efficiency. Structural

收稿日期：2026-03-20
基金项目：国家自然科学基金面上项目（22478157）
*通信作者：白仲虎 baizhonghu@jiangnan.edu.cn

localization indicated that P39 is located in the origin-binding domain (OBD), while Q202 is situated in the OBD-HD (homeodomain) transition region, in proximity to the OBD.【Conclusion】This study established a directed evolution and high-throughput screening platform for Rep protein and identified two beneficial Rep mutants, P39L and Q202H, which enhanced rAAV yield to 2.02-fold and 1.87-fold that of the control, respectively. OBD and its nearby regions are important sensitive areas affecting rAAV yield.

Keywords: recombinant adeno-associated virus; Rep protein; random mutagenesis; high-throughput screening; viral yield

重组腺相关病毒载体（recombinant adeno-associated virus，rAAV）具有免疫原性低、体内表达持续时间长及安全性较高等优点，已成为当前体内基因递送中应用最广、临床转化最成熟的载体体系之一[1-3]。近年来，rAAV相关基因治疗已在脊髓性肌萎缩症、遗传性视网膜疾病和血友病等疾病中取得重要进展[4-5]。截至2026年，全球已有9款AAV相关基因治疗产品获批上市，同时有超过200项临床试验持续推进，显示出巨大的临床应用潜力[4,6-7]。随着临床需求不断增长，rAAV高剂量给药、制备成本高和产能不足等问题日益突出，高效生产rAAV成为制约其进一步应用的重要瓶颈[8]。

目前，基于HEK293细胞的三质粒瞬时转染体系是rAAV实验室研究和产业化生产中最常用的技术路线[9-11]。近年来，围绕强化rAAV生成效率的研究逐渐由培养工艺优化转向生产质粒和包装元件的分子生物学设计[12-14]。已有研究表明，通过重组辅助元件、优化生产质粒组成或重新设计包装相关顺式/反式元件，可改善rAAV的产量。Ren等[15]进一步构建了对Rep蛋白和Cap蛋白进行双重诱导调控的表达系统，通过调节两者的表达时序与强度，将rAAV产量提高2.6倍，表明包装元件表达平衡与时序控制对生产效率具有显著影响。因此，包装相关元件的分子生物学设计是决定rAAV生产效率的重要因素之一[16-18]。

在三质粒转染系统中，Rep蛋白直接参与病毒基因组复制、包装及转录调控，是影响rAAV产量的核心因子之一[19-20]。相较于衣壳蛋白，Rep蛋白并非最终rAAV制剂的结构组成成分，因此对其进行工程改造理论上可在不改变组织特异性的前提下提高生产效率[21]。Jain等[22]通过对AAV2的*rep*基因全扫描突变文库系统评估单密码子替换和缺失对产量的影响，发现有益突变主要富集于起源结构域（origin-binding domain, OBD）区域，表明Rep蛋白具有可供工程改造的功能空间。此外，Rep蛋白的寡聚化在其多功能性中起关键作用。Musayev等[23]发现，连接Rep蛋白N端结构域与解旋酶结构域的连接子区域是寡聚化的重要组成，其中的保守芳香族残基Y224对Rep68的寡聚化和病毒活性至关重要。上述研究表明，Rep蛋白改造是提高rAAV产量的一种有效策略，但针对Rep蛋白关键位点的系统筛选、功能验证及结构–功能关系分析仍相对不足[24]。

本研究围绕Rep蛋白工程改造提高三质粒转染HEK293细胞生产rAAV产量这一目标，拟探究Rep蛋白序列变化对rAAV生产效率的影响，明确可提高rAAV产量的有益突变体及其位点特征；分析相关突变体在提高rAAV产量的同时是否影响病毒转导效率，并阐明其可能的作用基础，期望通过识别影响rAAV产量的Rep蛋白关键敏感位点，为Rep蛋白理性设计及rAAV高效生产策略优化提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料与主要试剂 DH5α大肠杆菌感受态购自上海生工生物工程股份有限公司。质粒pAAV-RC5（#104964）购自美国Addgene公司；质粒pHelper购自日本TaKaRa公司；质粒pAAV-CMV-EGFP购自美国Thermo Fisher Scientific公司。QuickMutation基因随机突变试剂盒购自碧云天生物技术有限公司；PrimeSTAR Max DNA聚合酶购自宝生物工程（大连）有限公司；MultiF Seamless Assembly Mix购自武汉爱博泰克生物科技有限公司；无内毒素质粒小提试剂盒和DNA回收试剂盒购自北京全式金生物技术股份有限公司；基因组DNA提取、逆转录及qPCR相关试剂购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；RNA提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技股份有限公司。硫酸卡那霉素购自麦克林生化科技股份有限公司；PEI Max购自美国Polysciences公司；三角摇瓶购自广州洁特生物过滤股份有限公司；带挡板24孔深孔板购自成都英德生物医药设备有限公司；BalanCD培养基购自美国FUJIFILM Irvine Scien-

tific公司，使用前添加4 mmol/L L-谷氨酰胺。

1.1.2　主要仪器　实时荧光定量PCR：Applied Biosystems；WB化学发光成像系统：ThermoFisher Scientific；荧光显微镜：Olympus；流式细胞仪：BD Biosciences；二氧化碳培养箱：ThermoFisher Scientific；酶标仪：BioTek Synergy H1。

1.2　*方法*

1.2.1　Rep蛋白随机突变文库的构建与定点饱和突变　以质粒pAAV-RC5为模板，设计随机突变片段上下游引物（附表），并按照随机突变试剂盒说明书对反应体系进行优化，对*rep*基因编码区进行随机突变扩增。PCR扩增产物经*Dpn* I消化去除甲基化模板后进行纯化，并采用Gibson Assembly方法组装至线性化的pAAV-RC5质粒骨架中，构建Rep蛋白随机突变表达质粒文库。重组质粒转化至感受态大肠杆菌中扩增，挑取单菌落进行测序，对文库的突变频率及突变偏好性进行初步评估，以确保文库中突变体主要包含1–3个氨基酸突变。随后挑取单菌落培养并提取质粒，作为后续筛选文库。

针对筛选获得的Rep蛋白突变体，分析其突变位点后，进一步采用定点饱和突变构建Rep蛋白突变体。通过设计含目标突变位点的引物（附表），以包装质粒为模板进行扩增，PCR产物经纯化后通过Gibson Assembly方法组装回载体骨架中。重组质粒经测序确认正确后，用于后续功能验证实验。

1.2.2　摇瓶中HEK293细胞三质粒瞬时转染生产rAAV　将HEK293细胞按照1.3×10^6 cells/mL接种至含30 mL BalanCD培养基的125 mL带挡板摇瓶中，并进行三质粒瞬时转染生成rAAV。以PEI Max为转染试剂，DNA与PEI的质量比为1∶1.4，总DNA用量为0.70 μg/mL。三质粒体系包括辅助质粒pHelper、穿梭质粒pAAV-CMV-EGFP和包装质粒pAAV-RC5，三者质量比为1∶1∶1。将质粒与转染试剂分别使用BalanCD培养基稀释后混匀，室温孵育15 min后加入细胞培养液中，然后放入摇床中继续培养。转染后24 h取样，用于检测*rep/cap*基因转录水平；转染后72 h收获细胞悬液，用于rAAV基因组滴度（vector genome, vg）测定及Rep蛋白与Cap蛋白表达分析。

1.2.3　Rep蛋白突变体高通量筛选技术　为实现Rep蛋白突变体的高效筛选，本研究建立了基于带挡板24孔深孔板的高通量筛选体系。采用带挡板的24孔深孔板进行细胞培养与三质粒瞬时转染，每孔培养体积为2 mL，摇床转速为200 r/min，转染方法参照摇瓶中细胞转染并按体积等比例缩放。转染后将24孔深孔板置于37 ℃、5% CO_2培养箱中继续培养72 h，随后检测各培养孔rAAV产量。为提升筛选通量，在初筛阶段将两种含不同Rep突变体的包装质粒等质量混合后共转染HEK293细胞，以rAAV基因组滴度为指标，将产量接近或高于对照组80%的培养孔定义为候选突变组。随后，将候选突变组内的两个Rep蛋白突变体分别在摇瓶中单独转染复验，并将rAAV产量显著高于野生型Rep蛋白对照组的突变体定义为Rep蛋白有益突变体。

1.2.4　rAAV基因组滴度检测　使用qPCR方法对样品中rAAV基因组滴度进行检测，用于表征rAAV产量。具体操作方法为：转染后72 h收集细胞悬液，采用含1% Pluronic F-68的TE缓冲液进行适当稀释。随后加入1 U TURBO DNase（Merck，德国），并于37 ℃孵育30 min，随后于75 ℃孵育10 min灭活DNase。然后加入1% SDS并于95 ℃加热处理10 min，使AAV衣壳变性并释放基因组DNA。采用EGFP特异性引物（附表）对样品中rAAV基因组DNA进行扩增并进行定量。以pAAV-EGFP质粒为标准品建立标准曲线。根据探针法qPCR试剂说明书配制反应体系，并使用StepOnePlus实时荧光定量PCR系统进行检测，并根据标准曲线计算样品中rAAV基因组滴度，结果以vg/mL表示。

1.2.5　Rep蛋白与Cap蛋白转录水平与蛋白表达水平检测　为分析Rep蛋白突变体对*rep*基因和*cap*基因转录的影响，在转染后24 h和72 h取样，按照总RNA提取试剂盒说明书提取细胞总RNA。随后使用反转录试剂盒去除基因组DNA并进行逆转录反应获得cDNA。以cDNA为模板，基于SYBR Green法使用StepOnePlus实时荧光定量PCR系统检测*rep*基因、*Rep78/68*基因和*cap*基因转录水平。以*GAPDH*作为内参基因，对样品的基因表达水平进行归一化处理。

为检测Rep蛋白与Cap蛋白表达水平，转染后72 h取样并提取细胞总蛋白。蛋白样品经SDS-PAGE分离后转膜，分别采用Rep蛋白与Cap蛋白特异性抗体进行孵育和显色。以β-actin为内参蛋白，比较

不同样品间Rep蛋白和Cap蛋白的表达差异。

1.2.6 rAAV样品制备及转导效率检测 在转导前24 h将受体细胞HEK293细胞按照3.0×10^5 cells/well接种至6孔板中，培养基为DMEM培养基补加5%胎牛血清。转导前更换为无血清DMEM培养基，并将rAAV样品按照1×10^5 vg/cell加入6孔板中进行转导。转导24 h后更换为含血清DMEM培养基继续培养。转导48 h后，使用胰酶消化并收集细胞，使用荧光显微镜观察EGFP表达情况，并使用流式细胞术检测EGFP阳性细胞比例，进行rAAV样品转导效率分析。

1.2.7 Rep78蛋白结构预测与突变位点定位分析 使用AlphaFold3 Server对Rep78蛋白氨基酸序列进行结构预测，并使用PyMOL软件对Rep蛋白有益突变体的关键突变位点进行三维定位。通过可视化分析突变位点在Rep78蛋白中的空间分布特征及其与功能区域的相对位置关系，从结构层面对突变体的功能进行分析。

1.2.8 统计学分析 实验结果以平均值±标准差（Mean ± SD）表示。除特别说明外，各实验均至少进行3次独立重复。数据整理、作图及统计分析采用GraphPad Prism 9.0软件完成。两组间比较采用t检验，多组间比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA）。

2 结果

2.1 高通量筛选获得Rep蛋白有益突变体

为获得能够提高rAAV产量的Rep蛋白突变体，本研究基于三质粒瞬时转染HEK293细胞生产rAAV体系，对Rep蛋白突变体文库进行24孔深孔板初筛和摇瓶复验，实验流程见图1。

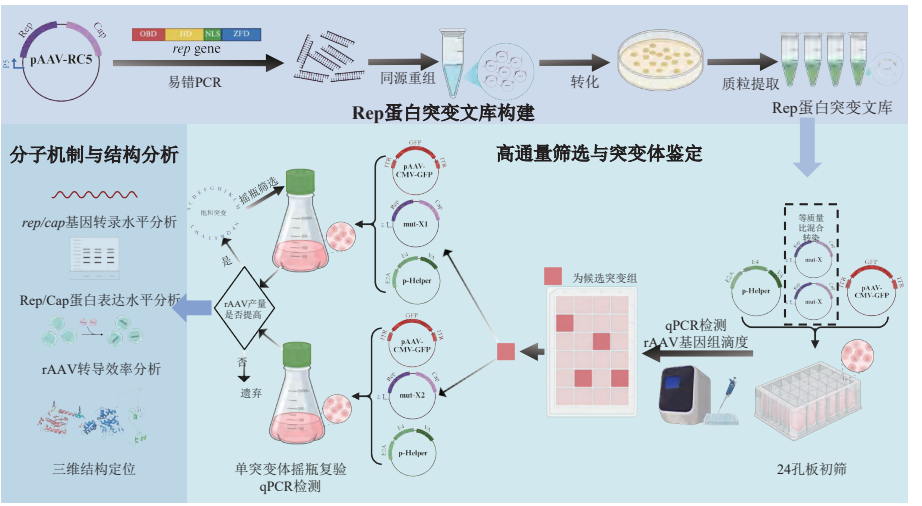


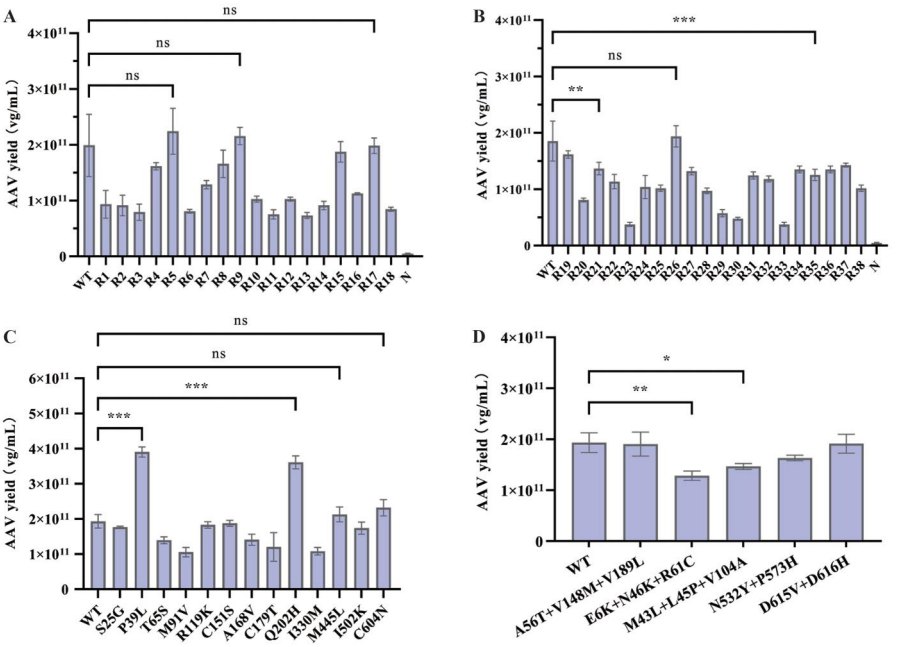
图1 Rep蛋白突变体高通量筛选与功能分析流程图

Fig. 1 Schematic workflow of high-throughput screening and functional analysis of Rep protein mutants

2.1.1 24孔深孔板高通量筛选获得候选突变组 基于HEK293细胞三质粒瞬时转染体系，以rAAV基因组滴度作为主要评价指标，对Rep蛋白突变文库进行24孔板高通量筛选。本研究共筛选了400个Rep蛋白突变体，展示其中具有代表性的两批次筛选（图2-A，B）。结果显示多数候选突变组rAAV产量低于对照组，仅约10%候选突变组的rAAV产量高于对照组。挑选rAAV产量接近或高于对照组80%的培养孔，野生型Rep蛋白对照组的rAAV产量为（1.99±0.56）×10^{11} vg/mL，最终获得R5、R8、R9、R15、R17、R19、R21、R26和R34共9个候选突变组，其rAAV产量范围为对照组的0.73–1.13倍，并对候选突变组所用的包装质粒进行基因测序。测序结果显示，各候选突变组中Rep蛋白突变体分别为R5：S25G与P39L，R8：T65S与M43L+L45P+V104A，R9：R119K与A56T+V148M+V189L，R15：A168V与C179T，R17：C151S与E6K+N46K+R61C，R19：M91V与Q202H，R21：I330M与M445L，R26：I502K与N532Y+P573H，R34：C604N与D615V+D616H。上述结果表明，该筛选体系可用于

Rep蛋白突变体文库的初步筛选。

2.1.2　摇瓶复验获得Rep蛋白有益突变体　基于24孔深孔板筛选结果，将R5、R8、R9、R15、R17、R19、R21、R26和R34共9个候选突变组内的两个Rep蛋白突变体分别在摇瓶中进行三质粒转染生产rAAV验证。摇瓶复验结果显示，野生型Rep蛋白对照组的rAAV产量为（1.93±0.19）×10^{11} vg/mL，Rep蛋白突变体P39L和Q202H的rAAV产量分别为（3.91±0.15）×10^{11} vg/mL与（3.61±0.19）×10^{11} vg/mL，分别为对照组的2.02和1.87倍（图2-C，D）。相比之下，Rep蛋白突变体M445L与C604N的rAAV产量分别为对照组的1.10倍与1.20倍，但与对照组相比差异无统计学意义；Rep蛋白多位点突变体（M43L+L45P+V104A，A56T+V148M+V189L，E6K+N46K+R61C，N532Y+P573H，D615V+D616H）的rAAV产量为对照组的0.66–0.99倍，均未表现出显著性增产效果。综合24孔深孔板筛选和摇瓶验证结果，确定Rep蛋白突变体P39L和Q202H为Rep蛋白有益突变体。上述结果表明，带挡板24孔深孔板高通量筛选与摇瓶复验可高效获得Rep蛋白有益突变体。



A，B：候选突变组的rAAV产量；C：候选突变组中单点突变体摇瓶复验结果；D：候选突变组中多点组合突变体摇瓶验证结果。*表示P<0.05，**表示P<0.01，***表示P<0.001，ns表示差异无统计学意义，下同

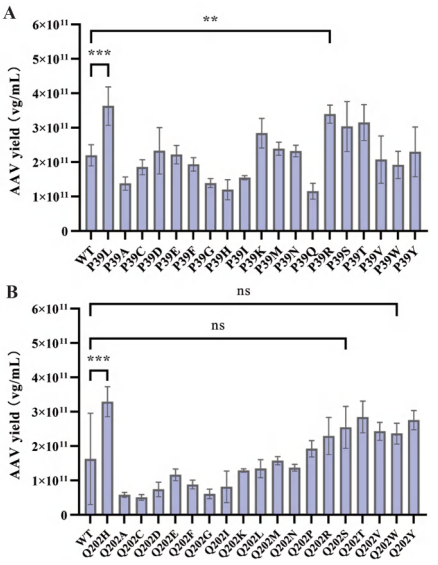
A, B: rAAV yields of candidate mutant groups. C: Shake-flask validation results of single-point mutants from candidate mutant groups. D: Shake-flask validation results of multi-point combination mutants from candidate mutant groups. *, **, and *** indicate P<0.05, P<0.01, and P<0.001, respectively; ns indicates no significant difference. The same below

图2　Rep蛋白突变体高通量筛选及摇瓶验证

Fig. 2　High-throughput screening and shake-flask validation of Rep protein mutants

2.1.3　Rep蛋白有益突变体突变位点饱和突变　为进一步提高rAAV产量，对Rep蛋白有益突变体突变位点P39和Q202进行饱和突变，并分析不同氨基酸替换对rAAV产量的影响（图3-A，B）。对于P39位点，在该批次转染中，野生型Rep蛋白对照组的rAAV产量为（2.22±0.31）×10^{11} vg/mL，P39L突变体的rAAV产量为（3.63±0.56）×10^{11} vg/mL，为对照组的1.65倍，提高效果最为明显；碱性氨基酸替换P39R和P39K的rAAV产量分别为对照组的1.54倍和1.29倍，但其产量低于P39L；疏水/非极性氨基酸替换对rAAV产量影响不具有规律性，其中P39L突变体对rAAV产量的提高表现最佳，而P39A与P39G突变体导致rAAV产量降低；而对于极性不带电氨基酸替换，P39S、P39T、P39N突变体的rAAV产量略微

提高但未表现出显著性差异，而P39Q突变体导致rAAV产量降低；酸性氨基酸替换P39D、P39E的rAAV产量与对照组相比差异无统计学意义。



A：P39位点饱和突变体rAAV产量；B：Q202位点饱和突变体rAAV产量

A: rAAV yields of saturation mutants at the P39 site. B: rAAV yields of saturation mutants at the Q202 site

图3 P39和Q202位点饱和突变体rAAV产量分析

Fig. 3 rAAV yields of saturation mutants at P39 and Q202 sites

对于Q202位点，该批次野生型Rep蛋白对照组的rAAV产量为（1.63±0.13）×10^{11} vg/mL。Q202H和Q202R突变体的rAAV产量较高，分别为（3.29±0.44）×10^{11} vg/mL和（2.30±0.54）×10^{11} vg/mL，分别是对照组的2.02倍和1.41倍；极性不带电氨基酸替换有利于提高rAAV产量，其中Q202S和Q202T突变体优于Q202N和Q202C突变体；而对于疏水/非极性氨基酸，Q202A、Q202F、Q202W、Q202M、Q202I、Q202Y、Q202P突变体可提高rAAV产量，而Q202L、Q202G、Q202V突变体的rAAV产量无显著性差异或降低；酸性氨基酸替换有利于提高rAAV产量。综上所述，对P39和Q202位点进行饱和突变未获得进一步优于P39L或Q202H的突变体，说明P39L和Q202H仍是本研究筛选范围内较有利于提高rAAV产量的突变形式。

2.2 Rep蛋白有益突变体提高rAAV产量的机制分析

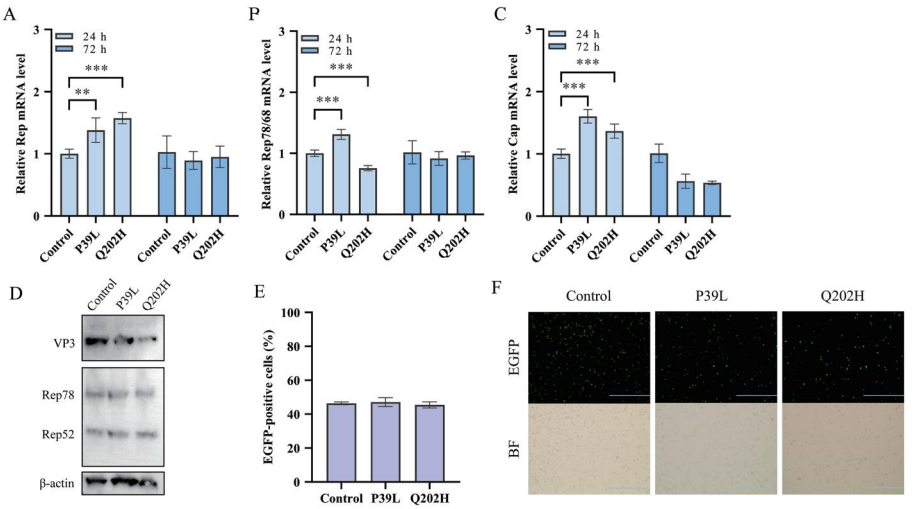
为探索Rep蛋白有益突变体P39L和Q202H提高rAAV产量的作用基础，进一步对Rep蛋白有益突变体P39L和Q202H的Rep蛋白与Cap蛋白转录和翻译水平、rAAV转导效率、三维结构进行分析。

2.2.1 Rep蛋白有益突变体Rep蛋白与Cap蛋白转录水平及表达水平分析 为探究Rep蛋白有益突变体P39L和Q202H提高rAAV产量的机制，本研究检测了转染后24 h和72 h的*rep*基因、*Rep78/68*基因与*cap*基因的转录水平，以及转染72 h后的Rep/Cap蛋白表达水平。结果显示，转染24 h后Rep蛋白有益突变体P39L和Q202H的*rep*基因转录水平（Rep蛋白总mRNA）分别为对照组的1.38倍和1.57倍，均高于对照组；P39L组*Rep78/68*基因转录水平为对照组的1.31倍，而Q202H组为对照组的0.75倍（图4-A、B）。转染72 h后，P39L组和Q202H组与对照组的*rep*基因转录水平与*Rep78/68*基因转录水平未表现出显著差异。转染24 h后，P39L和Q202H组*cap*基因转录水平分别为对照组的1.60倍和1.37倍，均高于对照组；转染72 h后，两组*cap*基因转录水平分别为对照组的0.56倍和0.53倍，低于对照组（图4-C）。Western blot结果显示，转染72 h后，P39L和Q202H组Rep78/68、Rep52/40及VP1/2/3蛋白条带强度与对照组接近，未观察到明显表达差异（图4-D）。上述结果表明，P39L和Q202H突变体可提高转染早期*rep/cap*转录水平，但在转染后期未持续提高Rep/Cap蛋白表达水平。

2.2.2 rAAV转导效率分析 为评估Rep蛋白有益突变体P39L和Q202H对rAAV转导效率的影响，使用流式细胞术和荧光显微镜检测相同vg用量下rAAV样品转导HEK293细胞48 h后的EGFP阳性细胞比例。结果显示，对照组、P39L组和Q202H组EGFP阳性细胞比例分别为46.37%±0.84%、47.10%±2.63%和45.47%±1.83%，组间差异无统计学意义（图4-E，F）。该结果表明，P39L和Q202H突变体可显著提高rAAV产量，但未显著改变所获rAAV的体外转导效率。

2.3 Rep78蛋白结构预测及有益突变位点定位分析

为进一步分析P39L和Q202H突变位点的结构分布特征，本研究基于AlphaFold3预测Rep78蛋白三维结构模型，对Rep蛋白P39和Q202两个位点进行空间定位分析（图5）。结果显示，P39位于Rep78蛋白的



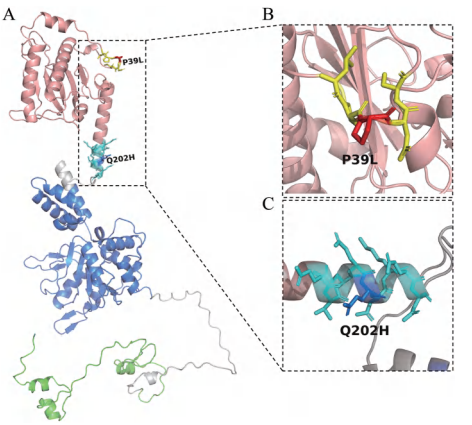
A:转染后24 h和72 h的*rep*基因转录水平；B:转染后24 h和72 h的*Rep78/68*基因转录水平；C:转染后24 h和72 h的*cap*基因转录水平；D:Western blot检测转染72 h后Rep78/68、Rep52/40、VP1/2/3蛋白表达情况；E:转染后48 h流式细胞术检测EGFP阳性细胞比例；F:转染后48 h EGFP表达的代表性荧光显微照片，比例尺100 μm

A: *rep* gene transcription levels at 24 h and 72 h post-transfection. B: *Rep78/68* gene transcription levels at 24 h and 72 h post-transfection. C: *cap* gene transcription levels at 24 h and 72 h post-transfection. D: Western blot analysis of Rep78/68, Rep52/40, and VP1/2/3 protein expression at 72 h post-transfection. E: Percentage of EGFP-positive cells detected by flow cytometry at 48 h post-infection. F: Representative fluorescence micrographs showing EGFP expression at 48 h post-transduction. Scale bars, 100 μm

图4　P39L和Q202H突变体对*rep/cap*基因转录、蛋白表达及rAAV转导效率的影响

Fig. 4　Effects of P39L and Q202H mutations on *rep/cap* gene transcription, protein expression and rAAV transduction efficiency

OBD区域，并处于该结构域表面。Q202位于OBD与HD的过渡区域，且更靠近OBD一侧。局部结构放大图显示，P39周围分布有密集的氨基酸侧链，Q202同样位于侧链分布较密集的结构域衔接区域，在Rep78全长结构中位于结构域衔接部位的邻近区域。上述功能实验表明，P39L与Q202H突变体分别将rAAV产量提升至对照组的2.02倍和1.87倍，而P39与Q202位点的饱和突变均未获得产量更高的突变体。综合饱和突变与结构定位分析可知，P39与Q202在氨基酸替换偏好及空间分布特征上存在显著差异：P39位于OBD结构边缘，对残基侧链长度及局部空间填充能力较为敏感；Q202毗邻结构域连接区，更偏好能参与极性相互作用或介导构象调节的残基类型。上述结果提示，P39与Q202虽不能直接认定为DNA接触残基，但其所处的OBD区域及OBD-HD过渡区域可能是影响Rep蛋白功能与rAAV产量的重要敏感区域。



A:Rep78蛋白预测结构及主要功能区域标注；B:P39位点在OBD区域中的空间位置；C:Q202位点在OBD-HD过渡区域中的空间位置

A: Predicted structure of Rep78 protein with annotation of major functional regions. B: Spatial localization of P39 in the OBD region. C: Spatial localization of Q202 in the OBD-HD transition region

图5　基于AlphaFold3预测的Rep78蛋白结构及P39、Q202位点定位

Fig. 5　AlphaFold3-predicted structure of Rep78 protein and the localization of P39 and Q202

3　讨论

随着rAAV在基因治疗领域的应用持续扩展，生产效率不足已成为制约其规模化制备与成本控制的关键瓶颈[14]。除培养工艺优化外，包装相关元件的工程化改造亦是提升rAAV产量的重要策略。Rep蛋白作为病毒基因组复制与包装过程的核心调控因

子，其序列优化对提高rAAV产量具有重要研究价值[15,25-26]。本研究基于Rep蛋白随机突变文库，建立了“24孔深孔板初筛+摇瓶复筛”的高通量筛选流程，成功获得可显著提高rAAV产量的Rep蛋白有益突变体P39L和Q202H，其rAAV产量分别提高至野生型Rep蛋白对照组的2.02倍和1.87倍。

高通量筛选方法的效率与可靠性是获得有益突变体的关键。本研究采用“双突变体等质量比混合转染”策略，在24孔深孔板中进行初筛，有效提升了筛选通量；随后通过摇瓶复验对候选孔内单个突变体进行独立验证，最终获得P39L和Q202H两个稳定增产突变体。该策略在兼顾筛选效率的同时，亦保证了结果的可靠性。值得注意的是，混合转染策略存在突变体效应相互抵消的可能性：若同一培养孔中同时包含增产与减产的两种突变体，可能导致该孔整体产量无显著提升，从而使增产突变体被漏筛。尽管如此，“24孔深孔板初筛+摇瓶复筛”的两步筛选策略仍为Rep蛋白突变体的高效挖掘提供了可行路径。

饱和突变分析显示，P39和Q202位点均具有明确的氨基酸替换偏好，但偏好模式存在差异。P39位点对具有适当侧链长度和局部填充能力的氨基酸（L、R、K）更为兼容；Q202位点则更偏好能够参与局部极性相互作用或构象调节的氨基酸（H、R、S、T、Y）。该结果表明，Rep蛋白的有益突变并非遵循统一的理化性质规律，而表现出强烈的位点依赖性，与大规模扫描研究结论相呼应[22,27-28]。

机制研究表明，P39L和Q202H虽在转染早期（24 h）对*rep*基因转录水平及*Rep78/68*基因水平产生一定影响，但在转染后期（72 h）其*rep*基因转录水平及蛋白表达水平均与野生型无显著差异，表明P39L和Q202H突变体并未通过改变Rep/Cap蛋白表达量来提高rAAV产量。结合其rAAV产量显著提升的结果，推测rAAV增产效应可能与病毒基因组复制或包装过程效率变化有关，而非通过持续提高Rep/Cap蛋白表达量实现。Rep78和Rep68作为复制起始的核心蛋白，其OBD负责识别复制起点，解旋酶结构域（helicase domain, HD）负责解旋DNA，二者协同决定病毒基因组复制效率[23,27-30]。因此，氨基酸替换可能在不改变蛋白表达水平的前提下，通过调控复制功能影响rAAV产量[31]。

结合结构定位分析，Rep蛋白的P39位于OBD区域的外围侧链堆积环境，Q202位于OBD与HD过渡区且更靠近OBD一侧。根据Jaiswal等[24]报道的AAV2 Rep68-AAVS1复合物结构，并结合本研究预测的Rep78蛋白结构发现两个位点虽均不直接位于DNA结合表面，但均能显著影响rAAV产量。这一发现揭示，除直接参与DNA结合或切割的残基外，位于功能结构域内部或结构域连接区的局部位点也可能对rAAV产量产生重要影响，与其他研究中将OBD及其邻近区域作为Rep蛋白工程改造的热点区域的结论相一致[24]。

综上，本研究建立的Rep蛋白突变体筛选流程为挖掘rAAV增产突变体提供了有效工具，筛选获得Rep蛋白突变体P39L和Q202H的位点特征分析进一步证实OBD及其邻近区域是Rep工程改造的重要靶区。结合近年来Rep蛋白工程化改造、包装质粒设计及表达调控研究进展，进一步证明Rep蛋白序列优化是提升rAAV生产效率的关键方向之一。

4 结论

本研究建立了Rep蛋白突变文库高通量筛选平台，通过“24孔深孔板初筛+摇瓶复验”策略，获得可将rAAV产量分别提高至对照组2.02倍和1.87倍的有益突变体P39L和Q202H，且未显著影响Rep/Cap蛋白表达水平及转导效率，提示其增产效应可能与基因组复制效率增强相关。结构定位显示P39位于OBD区域，Q202位于OBD-HD过渡区且靠近OBD，进一步证实OBD及其邻近区域是Rep工程改造的关键敏感区域。

文章所有附图附表请点击链接查看（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260819173459_NewsFile_62.pdf）。

参考文献

[1] Pupo A, Fernández A, Low SH, et al. AAV vectors: The Rubik's cube of human gene therapy [J]. Mol Ther, 2022, 30(12): 3515-3541.

[2] Wang JH, Gessler DJ, Zhan W, et al. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases [J]. Sig Transduct Target Ther, 2024, 9: 78.

[3] Cheng SY, Luo YW, Malachi A, et al. Low-dose recombinant adeno-associated virus-mediated inhibition of vascular endothelial growth factor can treat neovascular pathologies without inducing retinal vasculitis [J]. Hum Gene Ther, 2021, 32(13/14): 649-666.

[4] Keeler AM, Zhan W, Ram S, et al. The curious case of AAV immunology [J]. Mol Ther, 2025, 33(5): 1946-1965.
[5] Samelson-Jones BJ, George LA. Adeno-associated virus gene therapy for hemophilia [J]. Annu Rev Med, 2023, 74: 231-247.
[6] Ren H, Nie JQ, Song ZC, et al. Enhanced AAV production via rational design of a novel pHelper vector integrated with HSV-1 helper genes [J]. Synth Syst Biotechnol, 2026, 12: 352-363.
[7] 沈晓丽, 周群刚, 郑然, 等. 重组腺相关病毒对NK92细胞的转导条件优化 [J]. 中国药科大学学报, 2023, 54(1): 115-121.
Shen XL, Zhou QG, Zheng R, et al. Optimization of transduction conditions of recombinant adeno-associated vi-rus into NK92 cells [J]. J China Pharm Univ, 2023, 54(1): 115-121.
[8] Srivastava A, Mallela KMG, Deorkar N, et al. Manufacturing challenges and rational formulation development for AAV viral vectors [J]. J Pharm Sci, 2021, 110(7): 2609-2624.
[9] Joiner J, Huang ZR, McHugh K, et al. Process modeling of recombinant adeno-associated virus production in HEK293 cells [J]. Curr Opin Chem Eng, 2022, 36: 100823.
[10] Park S, Shin S, Lee H, et al. Enhancing the production of adeno-associated virus $(AAV)_2$ and AAV9 with high full capsid ratio in HEK293 cells through design-of-experiment optimization of triple plasmid ratio [J]. Biotechnol J, 2024, 19(3): 2300667.
[11] Lin YC, Boone M, Meuris L, et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations [J]. Nat Commun, 2014, 5: 4767.
[12] 李蕊蕊, 那道远, 王洪林, 等. 重组腺相关病毒瞬时表达系统的理性设计及其高效生产工艺的建立 [J]. 生物技术通报, 2024, 40(12): 61-71.
Li RR, (Na/Nuo) DY, Wang HL, et al. Rational design of recombinant adeno-associated virus transient expressing system and establishment of its efficient production process [J]. Biotechnol Bull, 2024, 40(12): 61-71.
[13] 张峒, 蒋卓含, 吴奕凡, 等. 利用多基因缺失型杆状病毒在昆虫细胞中生产腺相关病毒 [J]. 生物工程学报, 2024(2): 473-484.
Zhang T, Jiang ZH, Wu YF, et al. Production of adeno-associated virus in insect cells using multiple gene deleted baculovirus [J]. Chin J Biotechnol, 2024(2): 473-484.
[14] Quan DN, Shiloach J. rAAV production and titration at the microscale for high-throughput screening [J]. Hum Gene Ther, 2022, 33(1/2): 94-102.
[15] Ren H, Nie JQ, Song ZC, et al. Enhanced adeno-associated virus production in HEK293 cells via dual inducible control of cap and rep proteins [J]. Biotech & Bioengineering, 2025, 122(10): 2862-2873.
[16] Davidsson M, Negrini M, Hauser S, et al. A comparison of AAV-vector production methods for gene therapy and preclinical assessment [J]. Sci Rep, 2020, 10: 21532.
[17] Su WH, Patrício MI, Duffy MR, et al. Self-attenuating adenovirus enables production of recombinant adeno-associated virus for high manufacturing yield without contamination [J]. Nat Commun, 2022, 13: 1182.
[18] Wilmott P, Lisowski L, Alexander IE, et al. A user's guide to the inverted terminal repeats of adeno-associated virus [J]. Hum Gene Ther Meth, 2019, 30(6): 206-213.
[19] Cassell GD, Weitzman MD. Characterization of a nuclear localization signal in the C-terminus of the adeno-associated virus Rep68/78 proteins [J]. Virology, 2004, 327(2): 206-214.
[20] Patra AT, Tan E, Kok YJ, et al. Temporal insights into molecular and cellular responses during rAAV production in HEK293T cells [J]. Mol Ther Meth Clin Dev, 2024, 32(3): 101278.
[21] Mietzsch M, Eddington C, Jose A, et al. Improved genome packaging efficiency of adeno-associated virus vectors using rep hybrids [J]. J Virol, 2021, 95(19): e00773-e00721.
[22] Jain NK, Ogden PJ, et al. Comprehensive mutagenesis maps the effect of all single-codon mutations in the AAV2 rep gene on AAV production [J]. eLife, 2024, 12: RP87730.
[23] Musayev FN, Zarate-Perez F, Bishop C, et al. Structural insights into the assembly of the adeno-associated virus type 2 Rep68 protein on the integration site AAVS1 [J]. J Biol Chem, 2015, 290 (46): 27487-27499.
[24] Jaiswal R, Braud B, Hernandez-Ramirez KC, et al. Cryo-EM structure of AAV2 Rep68 bound to integration site AAVS1: insights into the mechanism of DNA melting [J]. Nucleic Acids Res, 2025, 53(3): gkaf033.
[25] Mahon MJ. Vectors bicistronically linking a gene of interest to the SV40 large T antigen in combination with the SV40 origin of replication enhance transient protein expression and luciferase reporter activity [J]. BioTechniques, 2011, 51(2): 119-126.
[26] Asokan A, Schaffer DV, Jude Samulski R. The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads [J]. Mol Ther, 2012, 20(4): 699-708.
[27] Davis MD, Wu JW, Owens RA. Mutational analysis of adeno-associated virus type 2 Rep68 protein endonuclease activity on partially single-stranded substrates [J]. J Virol, 2000, 74(6): 2936-2942.
[28] Seyffert M, Glauser DL, Schraner EM, et al. Novel mutant AAV2 rep proteins support AAV2 replication without blocking HSV-1 helpervirus replication [J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0170908.
[29] Zarate-Perez F, Bardelli M, Burgner JW, et al. The interdomain linker of AAV-2 Rep68 is an integral part of its oligomerization domain: role of a conserved SF3 helicase residue in oligomerization [J]. PLoS Pathog, 2012, 8(6): e1002764.
[30] Hickman AB, Ronning DR, Perez ZN, et al. The nuclease domain of adeno-associated virus rep coordinates replication initiation using two distinct DNA recognition interfaces [J]. Mol Cell, 2004, 13(3): 403-414.
[31] Chen YX, Hu SL, Lee W, et al. A comprehensive study of the effects by sequence truncation within inverted terminal repeats (ITRs) on the productivity, genome packaging, and potency of AAV vectors [J]. Microorganisms, 2024, 12(2): 310.

（责任编辑　朱琳峰）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):318-327

重组人白细胞介素-27的表达、纯化及初步鉴定

任彦宵[1, 2] 温赛[1*] 谭天伟[2]
（1.北京工商大学轻工科学与工程学院，北京 100048；2.北京化工大学国家生物炼制能源研发中心，北京 100029）

摘 要： 【目的】重组人白细胞介素-27（rh IL-27）单链融合蛋白在大肠杆菌中异源表达时易形成包涵体。通过引入促溶标签筛选与分子伴侣共表达的协同策略，以实现该蛋白的高比例可溶表达、纯化与初步鉴定。【方法】将人工合成的人IL-27单链融合基因克隆至pET-32a(+)载体。通过系统筛选6种促溶标签（XXA、SUMO、GST、NusA、TrxA及MBP）及5套分子伴侣共表达系统，以获得高可溶性表达方案。经镍柱亲和层析纯化目的蛋白，采用SDS-PAGE和Western blot进行鉴定。去除内毒素后，利用ELISA和CCK-8法检测rh XXA-IL-27与抗体的结合能力及其对人乳腺癌MCF-7细胞增殖的抑制作用。【结果】构建了IL-27融合基因及6种促溶标签表达载体。经筛选，XXA标签的促溶效果最佳，其融合蛋白的可溶性表达水平达64.91%。Western blot结果确认其为特异性目的蛋白。进一步引入分子伴侣pGro7与XXA标签共表达后，rh XXA-IL-27的最高表达量达46.4 mg/L，经镍柱纯化后获得较高浓度和纯度的目的蛋白。体外活性实验表明，30 μg/mL的rh XXA-IL-27处理48 h可显著抑制MCF-7细胞增殖。【结论】通过促溶标签（特别是XXA标签）与分子伴侣pGro7的协同策略，攻克了单链融合蛋白IL-27在大肠杆菌中易形成包涵体的难题，实现了XXA-IL-27融合蛋白的高效可溶性表达与纯化，获得了具有抑制MCF-7细胞增殖活性的XXA-IL-27。

关键词： 人白细胞介素-27；原核表达；促溶标签；分子伴侣；MCF-7细胞；细胞增殖抑制
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0250

Expression, Purification and Preliminary Identification of Recombinant Human Interleukin-27

REN Yan-xiao[1, 2] WEN Sai[1*] TAN Tian-wei[2]
（1. *School of Light Industry Science and Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing* 100048; 2. *National Energy R&D Center for Biorefinery, Beijing University of Chemical Technology, Beijing* 100029）

Abstract: 【Objective】 Recombinant human interleukin-27 (rh IL-27) single-chain fusion protein tends to form inclusion bodies when heterologously expressed in *Escherichia coli*. In this study, we aimed to achieve high-ratio soluble expression, purification, and preliminary characterization of the protein by employing a synergistic strategy that combined the screening of solubilization tags with the co-expression of molecular chaperones. 【Method】 The synthesized human IL-27 single-chain fusion gene was cloned into the pET-32a(+) vector. High-solubility expression schemes were obtained by systematically screening six solubilization tags (XXA, SUMO, GST, NusA, TrxA, and MBP) and five sets of molecular chaperone co-expression systems. The target protein was purified via nickel affinity chromatography and identified using SDS-PAGE and Western blot. After endotoxin removal, ELISA and CCK-8 assays were used to detect the binding affinity of rh XXA-IL-27 with antibodies and its inhibitory effect on the proliferation of human breast cancer MCF-7 cells. 【Result】 Expression vectors for the IL-27 fusion gene and six solubilization tags were constructed. Screening results indicated that the XXA tag provided the best solubilization effect, with the soluble expression level of its fusion protein reaching 64.91%. Western blot analysis confirmed the specificity of the target protein. Upon further introduction of the molecular chaperone pGro7 for co-expression with the XXA tag, the maximum expression of rh XXA-IL-27 reached 46.4 mg/L, and the target protein was obtained at high concentration and purity after nickel column purification. *In vitro* activity assays demonstrated that treatment with 30 μg/mL rh XXA-IL-27 for 48 h significantly inhibited the proliferation of MCF-7 cells. 【Conclusion】 The

收稿日期：2026-03-02
基金项目：国家自然科学基金项目（U24A6011）
*通信作者：温赛 wensai@btbu.edu.cn

synergistic strategy combining solubilization tags (especially the XXA tag) with the molecular chaperone pGro7 successfully addressed the challenge of inclusion body formation for the single-chain fusion protein IL-27 expressed in *E. coli*. This approach realized the efficient soluble expression and purification of the XXA-IL-27 fusion protein, yielding XXA-IL-27 with potent inhibitory activity against MCF-7 cell proliferation.

Keywords: human interleukin-27; prokaryotic expression; solubility-enhancing tags; molecular chaperones; MCF-7 cells; cell proliferation inhibition

白细胞介素-27（interleukin-27, IL-27）是IL-12细胞因子家族的重要成员，由p28亚基和EBI3（Epstein-Barr virus induced gene 3）亚基非共价结合形成异源二聚体蛋白[1-2]。该因子在机体免疫微环境调控及抗肿瘤治疗策略开发等研究领域中具有重要的应用价值[3]。作为一种多效性免疫调节因子，IL-27不仅能够促进Th1细胞的分化和$CD4^+$ T细胞的增殖，还可通过激活自然杀伤细胞的细胞毒性，对乳腺癌、头颈部鳞癌等多种实体瘤的恶性增殖产生直接抑制作用[4-5]。基于上述免疫调节功能与抗肿瘤活性，IL-27被视为极具发展潜力的新型免疫治疗候选分子。

然而，IL-27复杂的异源二聚体结构为其工程化制备带来了严峻挑战。传统的真核表达系统（如哺乳动物细胞）虽能提供完整的翻译后修饰，但存在生产周期冗长、培养环境严苛以及生产成本高昂等局限。与之相比，大肠杆菌（*Escherichia coli*）原核表达系统凭借其遗传背景清晰、增殖速度快以及生产成本低廉等优势，依然是重组蛋白基础研究与工业化规模生产的首选表达宿主[6-7]。但是，大肠杆菌在异源表达由多亚基组成的复杂人源细胞因子时，极易因胞内还原性环境阻碍二硫键形成、多肽链空间折叠受阻及内源分子伴侣网络超载，导致目的蛋白以无生物学活性的“包涵体”形式发生不可逆沉淀，严重制约了可溶性活性蛋白的获取[8-9]。

针对包涵体问题，现有研究多依赖后期变性与体外复性工艺，但复杂二聚体细胞因子的复性过程繁琐、效率低下，天然构象恢复率极低。为此，研究者尝试在目的基因N端融合促溶标签（如TrxA、GST、SUMO等）以改善蛋白可溶性[10]，该策略能够为新生多肽链提供空间位阻缓冲与微观水化层保护，降低分子的非特异性疏水聚集[11-13]。此外，分子伴侣的共表达策略，已被普遍视为主动干预蛋白正确折叠的核心机制之一[14]。然而，对于具有较大分子量的单链IL-27，单一标签或伴侣的效果有限，难以满足其高效折叠的需求。将高亲水性融合标签的“被动保护”与GroEL/ES等分子伴侣的“主动折叠”相结合，这一组合策略在解决难表达重组蛋白的制备难题上具有潜在优势。

基于上述背景，早期虽有采用柔性连接子构建单链融合蛋白的策略，但此类复杂蛋白在大肠杆菌中异源表达时极易形成包涵体。为解决重组人白细胞介素-27（rh IL-27）的可溶性表达难题，本研究通过引入不同理化特性的N端促溶标签（含新型电荷阻聚标签XXA[15]）并联合分子伴侣共表达系统，构建一套“促溶标签–分子伴侣协同”的多维调控策略，以实现rh IL-27的高效可溶性表达。

1　材料与方法

1.1　材料

大肠杆菌pET-32a(+)载体由本实验室保存，pET-32a-IL-27质粒由北京六合华大基因科技有限公司合成，*E. coli* Trans10、*E. coli* BL21(DE3)感受态、2×Basic Assembly Mix、质粒提取试剂盒等购自TransGen Biotech。2×Taq Mix购自Biomed，DNA凝胶回收试剂盒购自Vazyme，DL2000 marker购自TaKaRa公司，SDS-PAGE电泳套装购自Bio-Rad，Ni NTA 6FF购自永联生物科技，IPTG购自宝如亿，兔抗IL-27多克隆抗体购自ABclonal公司，IL-27A p28单克隆抗体购自武汉三鹰生物，蛋白Marker、BCA蛋白浓度测定试剂盒、小鼠抗His标签抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG以及羊抗兔IgG-HRP购自索莱宝公司，人白细胞介素27酶联免疫吸附测定试剂盒购自上海江莱生物，PVDF膜、Western快速转膜液与Western显影液、蛋白内毒素清除试剂盒、重组胰酶细胞消化液等购自上海碧云天，MCF-7人乳腺癌细胞与SNLM-060培养基购自武汉尚恩生物，细胞增殖–毒性检测试剂盒（CCK-8）购自北京兰博利德。PCR仪购自MJ RESEARCH. INC，凝胶成像系统购自FluorChemTM 5500，高压匀浆机购自ATS，酶标仪购自Thermo，高速台式冷冻离心机购自湖南湘仪。

1.2 方法

1.2.1 单链融合基因IL-27原核表达载体的构建 人IL-27基因表达载体构建示意图如图1所示，根据GenBank中人EBI3（NM_005755.3）和p28（NM_145659.3）序列，中间通过$(Gly_4Ser)_3$柔性连接子连接，其由GGGGS重复3次组成，可为两亚基提供足够空间柔性，减少位阻干扰，促进蛋白正确折叠，维持其天然构象与活性。为便于后续的蛋白纯化与检测，在p28亚基的羧基末端（3′端）引入了6×His标签，该标签分子量小、免疫原性低，不影响蛋白的结构与功能。经过密码子优化后，由北京六合华大基因科技有限公司进行合成。以此合成基因为模板，设计特异性引物进行PCR扩增。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测后，切胶回收目标DNA片段，并将目的基因序列连入pET-32a载体，所构建的原核重组质粒命名为pET-32a-IL-27。

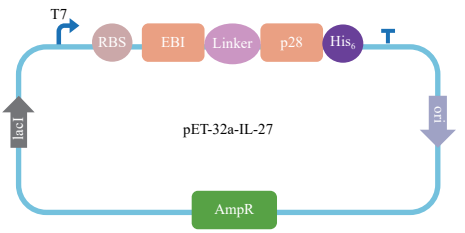


图1 pET-32a-IL-27的表达载体构建示意图

Fig. 1 Schematic diagram of vector construction for pET-32a-IL-27

1.2.2 重组蛋白IL-27的表达 将构建的重组质粒pET-32a-IL-27与空载体pET-32a(+)分别转入*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中。挑取阳性单菌落，接种于5 mL LB液体培养基中，37 ℃下培养12–14 h，以1%（v/v）的接种量转接至TB培养基中。当OD_{600}值达到0.4–0.6时，于37 ℃、200 r/min条件下，加入IPTG至终浓度为0.2 mmol/L以诱导表达，另设未加IPTG诱导的对照组。诱导14 h后，于4 000 r/min离心20 min，弃上清，收集菌体沉淀。按1∶10（w/v）比例加入Tris-HCl缓冲液重悬，采用高压匀浆破碎仪（1 000–1 200 bar，连续破碎3遍）对菌体进行彻底的物理裂解。破菌液经4 ℃、12 000 r/min离心20 min，分别收集可溶性组分与沉淀，进行SDS-PAGE电泳分析。

1.2.3 多种促溶标签表达载体的构建与鉴定 为提升目标多肽IL-27的可溶性表达水平，本研究系统考察了6种促溶标签（XXA、SUMO、GST、NusA、TrxA及MBP）的影响，不同标签载体构建示意图如图2所示。利用实验室保存的各融合基因模板，通过PCR扩增获得相应促溶标签片段（扩增标签引物见附表）。将扩增产物与经线性化的pET-32a-IL-27载体骨架进行Gibson连接，构建系列N端融合表达载体。将连接产物转化入*E. coli* Trans10感受态细胞，涂布于含氨苄抗性的LB固体培养基上。次日挑取单菌落，进行PCR鉴定，经此步骤确认无误的重组质粒，送至六合华大基因科技有限公司进行测序。测序结果验证正确的连接产物，再转入*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞，以供后续表达分析。

1.2.4 分子伴侣共表达系统的构建与诱导 在筛选

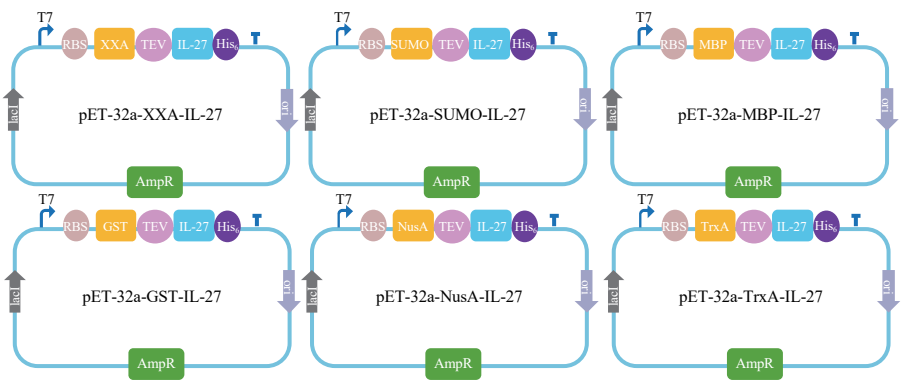


图2 不同标签表达载体构建示意图

Fig. 2 Schematic diagram of constructing vector with different tags

出最佳促溶标签后，将相应的重组质粒与分子伴侣质粒共转化至*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中，通过含有氨苄青霉素（100 μg/mL）和氯霉素（20 μg/mL）的LB固体培养基进行双抗性抗性筛选。挑取阳性单克隆接种于双抗液体培养基中，37 ℃培养至对数生长期（OD_{600}约为0.6–0.8）时，根据分子伴侣质粒特性（表1）加入相应诱导剂：先以L-阿拉伯糖（终浓度0.5 mg/mL）或四环素（终浓度5 ng/mL）预诱导分子伴侣表达，随后加入终浓度为0.2 mmol/L的IPTG诱导目的蛋白。于16 ℃继续培养14 h。

表1　各质粒编码的伴侣蛋白质种类及诱导物

Table 1　Types of chaperone proteins encoded by each plasmid and inducers

No.	质粒 Plasmid	伴侣蛋白质 Chaperone protein	启动子 Promoter	诱导物 Inducer	抗性标记 Selection marker
1	pG-KJE8	*dna*K-*dna*J-*grp*E	*ara*B	L-Arabinose	Cm
		*gro*ES-*gro*EL	*Pzt*-1	Tetracycline	
2	pGro7	*gro*ES-*gro*EL	*ara*B	L-Arabinose	Cm
3	pKJE7	*dna*K-*dna*J–*grp*E	*ara*B	L-Arabinose	Cm
4	pG-Tf2	*gro*ES-*gro*EL-tig	*Pzt*-1	Tetracycline	Cm
5	pTf16	tig	*ara*B	L-Arabinose	Cm

1.2.5　Western blot检测rh IL-27表达　PVDF膜经甲醇活化后，依标准湿法转膜装置予以组装，于恒流400 mA条件下实施转膜操作，20 min后转膜完毕，用TBST洗涤3次，将膜置于含5%脱脂奶粉的TBST中，于室温下封闭2 h；随后TBST洗涤3次，一抗选用兔抗IL-27多克隆抗体（1∶5 000稀释），4 ℃孵育过夜。充分洗涤后，再与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG（1∶5 000稀释）于室温孵育1 h。采用ECL化学发光法显色，利用凝胶成像系统收集信号并拍摄图像。

为进一步验证目的条带，将上述曝光后的膜置于2 mol/L NaOH溶液中，室温振荡洗涤5 min，以去除结合的抗体。再生后的膜经TBST彻底清洗，再以5%脱脂奶粉进行封闭，换用小鼠抗His标签抗体（1∶5 000稀释）作为一抗，4 ℃孵育过夜。二抗孵育及ECL显色操作，同上述步骤。

1.2.6　重组IL-27表达含量的ELISA检测　细胞破碎后，4 ℃ 1 000×*g*离心20 min，取胞内上清用于后续检测。ELISA检测试剂盒先行平衡至室温，配制洗涤液、梯度稀释标准品及工作液。于预包被板中加入标准品或待测样本（每孔100 μL），37 ℃孵育60 min。弃去孔内液体后，于每孔中添加100 μL生物素化检测抗体，37 ℃孵育60 min。洗板3次，随后每孔加入100 μL酶结合物工作液，37 ℃再次孵育30 min。洗板5次后，向各孔加入90 μL TMB底物，避光条件下显色15 min，最后加入50 μL终止液。立即用酶标仪在450 nm波长处测定各孔的光密度值（OD值）。以标准品浓度及其对应的OD值为基础绘制标准曲线，并据此计算待测样本中IL-27的含量。

1.2.7　镍柱纯化rh IL-27蛋白　选取重组人IL-27表达量最高的菌株进行规模化诱导表达。收集菌体后，将其重悬于裂解缓冲液（含500 mmol/L NaCl的磷酸盐缓冲液，pH 7.5）中。为最大程度提高微量目的蛋白的初始亲和吸附效率，该细胞重悬液中未添加咪唑。经高压匀浆破碎后，离心获取可溶性上清液，经0.22 μm滤膜过滤后备用。采用Ni-NTA 6FF亲和层析介质对目的蛋白进行纯化。上样前，先使用3–5个柱体积（CV）的平衡缓冲液（含20 mmol/L咪唑、500 mmol/L NaCl的磷酸盐缓冲液，pH 7.5）对层析柱进行充分平衡，至UV_{280}吸收基线平稳。随后将样品上清液以1 mL/min的流速恒速上样。上样完成后，继续使用含20 mmol/L咪唑的平衡缓冲液冲洗层析柱5–10 CV，以充分洗去发生非特异性结合的大肠杆菌内源杂蛋白。随后，采用咪唑浓度梯度为30、75、150、300及500 mmol/L的洗脱缓冲液进行阶跃式洗脱，流速设为2 mL/min。实时监测UV_{280}吸收峰，并分别收集各梯度洗脱液。

1.2.8　XXA标签的酶切去除　取经超滤脱盐后的蛋白样品，采用BCA法测定蛋白浓度。在50 μL反应体系中，依次加入8 μg融合蛋白、2.5 U携带GST/His双标签的TEV Plus Protease以及1× TEV酶切缓冲液

（50 mmol/L Tris-HCl，50 mmol/L NaCl，0.5 mmol/L EDTA，1 mmol/L DTT，pH 8.0），用无菌去离子水补足体积。反应液轻柔混匀后置于4 ℃孵育过夜（约16 h）。酶切结束后，将反应物在4 ℃以12 000×*g*离心10 min以去除微量沉淀，收集上清备用，并取少量样品通过SDS-PAGE检测酶切效率。鉴于去标签后的IL-27稳定性显著下降，本研究后续的生物学活性评价均采用纯化后的rh XXA-IL-27融合蛋白。

1.2.9 蛋白样品内毒素清除 取500 μL待处理重组XXA-IL-27蛋白样品于无内毒素离心管中，依次加入100 μL Endotoxin Removal Solution A和120 μL Endotoxin Removal Solution B，涡旋混匀后，将样品置于4 ℃孵育5 min，随后于37 ℃孵育1 min，溶液呈现乳白色浑浊。室温下12 000–14 000×*g*离心5 min，使水相与有机相分离。小心吸取上层水相（含去内毒素的目的蛋白）转移至新的无内毒素离心管中，弃去下层有机相。处理后样品用于后续细胞实验。

1.2.10 CCK-8测定rh IL-27抑制乳腺癌细胞MCF-7增殖水平 MCF-7人乳腺癌细胞培养在含有10%胎牛血清（FBS）、10 μg/mL胰岛素和1%青链霉素（P/S）以及非必需氨基酸（NEAA）的EMEM培养基中。该细胞株以贴壁培养形式生长，在37 ℃，5% CO_2和饱和湿度下培养。

取对数生长期的人乳腺癌细胞株MCF-7，用细胞培养液调整细胞密度至4×10^{4}个/mL，以每孔100 μL的体积接种于96孔板。在37 ℃、5% CO_2培养箱中培养过夜，以确保细胞充分贴壁生长。待细胞贴壁后，吸弃上清，加入含不同终浓度（5、10、15、20、25、30 μg/mL）rh XXA-IL-27融合蛋白的新鲜EMEM培养基。实验设置空白对照组（仅含培养基，无细胞）及阴性对照组（细胞加含等比例蛋白溶剂的完全培养基），每组设3个复孔。将培养板置于37 ℃、5% CO_2及饱和湿度的培养箱中继续培养48 h。培养结束后，向每孔加入10 μL CCK-8试剂，继续孵育2 h。随后用酶标仪在450 nm波长处检测各孔的光密度值（OD值）。根据下述公式计算各组细胞的存活率：

细胞存活率（%）=（实验组OD值 – 空白组OD值）/（阴性对照组OD值 – 空白组OD值）×100%

1.2.11 数据处理与统计学分析 SDS-PAGE灰度分析：采用ImageJ软件对SDS-PAGE凝胶中的目的蛋白条带进行灰度扫描与定量分析（所有灰度值均已扣除同胶位的背景空白值）。蛋白的可溶性表达比例计算方式为：

可溶性比例（%）=［上清组分灰度值/（上清组分灰度值+沉淀组分灰度值）］×100%

细胞增殖抑制与IC_{50}计算：体外细胞实验均独立重复3次，每次设3个平行复孔。实验数据采用SPSS 26.0软件进行统计学分析，对各组数据进行正态分布检验和方差齐性检验。结果均以平均值±标准差（Mean±SD）表示。多组间数据比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA），并结合Tukey法进行事后多重比较。相关图表使用Origin 2021软件绘制。在统计图中，采用不同小写字母标记组间差异，不同字母表示差异具有统计学意义（P<0.05）。采用非线性回归拟合计算半数抑制浓度（IC_{50}值）。

2 结果

2.1 IL-27融合基因的构建与验证

以合成的人IL-27基因为模板，经PCR扩增获得目的基因片段，琼脂糖凝胶电泳结果显示在约1 388 bp处出现特异性条带，与预期大小一致（附图1）。测序结果进一步确认EBI3、linker及p28序列连接正确，无突变或缺失，表明重组质粒pET-32a-IL-27构建成功。

2.2 重组IL-27蛋白在大肠杆菌中的表达

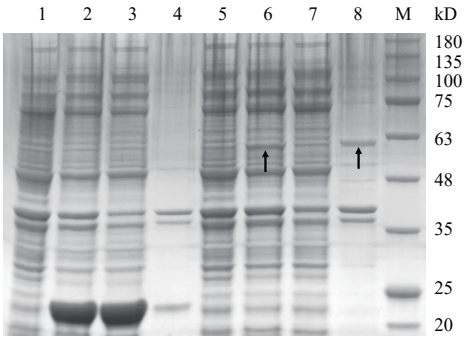
为探究重组蛋白IL-27的表达情况，将含有pET-32a-IL-27重组质粒和pET-32a空载体的*E. coli* BL21（DE3）菌株经IPTG诱导表达后，进行SDS-PAGE分析。结果如图3所示。

与未诱导的菌体相比，诱导后的IL-27重组菌在相对分子质量约54 kD处出现明显的新增条带，与融合蛋白IL-27的理论分子量一致，而空载体pET-32a(+)对照组各泳道（泳道1–4）均未见相应条带。

进一步对重组菌株破碎后的上清和沉淀进行分析，结果显示，目的蛋白主要存在于诱导后菌体的沉淀组分中（泳道8），而在可溶性上清组分（泳道7）中含量极低。

2.3 促溶标签对IL-27可溶性表达的影响

以DNA Marker为参照，6种促溶标签重组质粒的PCR扩增产物均在预期大小处显示特异性条带，与理论值相符（相关琼脂糖凝胶电泳图见附图2）。



1：pET-32a(+)未诱导；2：pET-32a(+)全细胞；3：pET-32a(+)胞内上清；4：pET-32a(+)胞内沉淀(约20 kD处条带为空载体表达的标签多肽)；5：IL-27未诱导；6：IL-27全细胞；7：IL-27胞内上清；8：IL-27胞内沉淀；M：protein marker

1: pET-32a (+) uninduced; 2: pET-32a (+) whole cells; 3: pET-32a (+) intracellular supernatant; 4: pET-32a (+) intracellular pellet (the band at approximately 20 kD corresponds to the tag polypeptide expressed by the empty vector); 5: IL-27 uninduced; 6: IL-27 whole cells; 7: IL-27 intracellular supernatant; 8: IL-27 intracellular pellet; M: protein marker

图3　不同蛋白表达形式的SDS-PAGE电泳分析

Fig. 3　SDS-PAGE electrophoresis analysis of various protein expression form

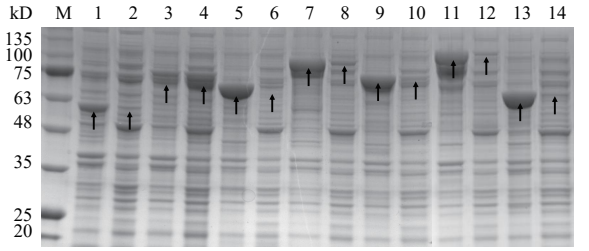
将融合不同N端促溶标签（XXA、SUMO、MBP、GST、NusA、TrxA）的重组质粒分别转化*E. coli* BL21(DE3)，经IPTG诱导后进行SDS-PAGE分析，结果如图4所示。

ImageJ灰度值分析结果显示（图5-A），各标签融合蛋白在胞内上清与沉淀中的分布比例存在显著差异（为排除宿主内源蛋白干扰，空载体平行作为对照，见附图3）。其中，XXA标签融合蛋白在上清中的目的蛋白占比最高，可溶性达64.91%；ELISA进一步测定其表达量约为对照组（无标签）的1.73倍（图5-B）。MBP及GST标签融合蛋白在上清中可见部分条带。相比之下，TrxA、SUMO及NusA标签融合蛋白的目的条带主要集中于沉淀组分，上清中几乎未检测到明显蛋白条带。

2.4　Western blot鉴定

纯化后的蛋白经SDS-PAGE分离后转移至PVDF膜，分别与抗His标签抗体（图6-A）和抗IL-27 p28多克隆抗体（图6-B）进行免疫印迹反应。

免疫印迹结果显示，抗His标签抗体与抗IL-27抗体在预期分子量位置及低分子量区域（约50 kD、25 kD）呈现出高度吻合的杂交带型。这种抗原表位与亲和标签的共定位，证实了纯化产物为重组人IL-27，并揭示了体系中存在部分源自目的蛋白的截短衍生物。

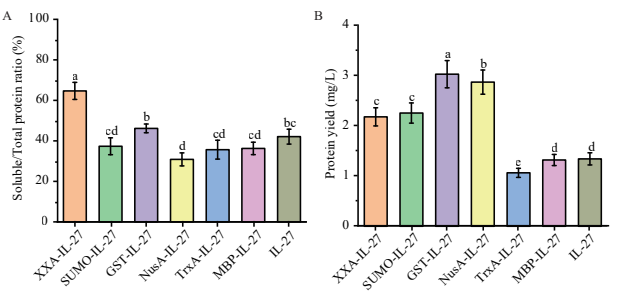


M：Protein marker；1：IL-27胞内沉淀；2：IL-27胞内上清(54 kD)；3：XXA-IL-27胞内沉淀；4：XXA-IL-27胞内上清(71 kD)；5：SUMO-IL-27胞内沉淀；6：SUMO-IL-27胞内上清(66 kD)；7：MBP-IL-27胞内沉淀；8：MBP-IL-27胞内上清(91 kD)；9：GST-IL-27胞内沉淀；10：GST-IL-27胞内上清(76 kD)；11：NusA-IL-27胞内沉淀；12：NusA-IL-27胞内上清(105 kD)；13：TrxA-IL-27胞内沉淀；14：TrxA-IL-27胞内上清(66 kD)

M: Protein marker; 1: IL-27 intracellular pellet; 2: IL-27 intracellular supernatant (54 kD); 3: XXA-IL-27 intracellular pellet; 4: XXA-IL-27 intracellular supernatant (71 kD); 5: SUMO-IL-27 intracellular pellet; 6: SUMO-IL-27 intracellular supernatant (66 kD); 7: MBP-IL-27 intracellular pellet; 8: MBP-IL-27 intracellular supernatant (91 kD); 9: GST-IL-27 intracellular pellet; 10: GST-IL-27 intracellular supernatant (76 kD); 11: NusA-IL-27 intracellular pellet; 12: NusA-IL-27 intracellular supernatant (105 kD); 13: TrxA-IL-27 intracellular pellet; 14: TrxA-IL-27 intracellular supernatant (66 kD)

图4　SDS-PAGE电泳分析不同促溶标签对IL-27可溶性表达的影响

Fig. 4　SDS-PAGE analysis of the effects of different solubility tags on the soluble expression of rh IL-27

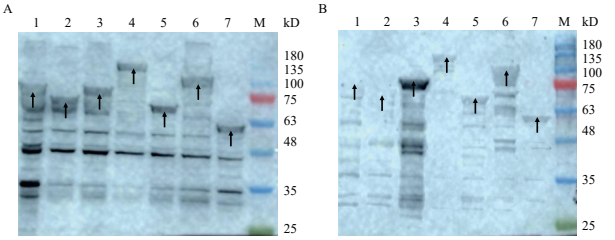


不同字母表示组间差异显著(P<0.05)，下同

Different letters indicate significant differences among groups (P<0.05). The same below

图5　不同促溶标签下rh IL-27的可溶性灰度分析(A)与总表达量ELISA分析(B)

Fig. 5　Densitometric analysis of rh IL-27 solubility (A) and ELISA quantification of total expression levels (B) with different solubility-enhancing tags



A:抗His标签抗体;B:抗IL-27多克隆抗体。1:XXA-IL-27(71 kD);2:SUMO-IL-27(66 kD);3:GST-IL-27(76 kD);4:NusA-IL-27(105 kD);5:TrxA-IL-27(66 kD);6:MBP-IL-27(91 kD);7:IL-27(54 kD);M:protein marker

A: Anti-His-tag antibody; B: anti-IL-27 polyclonal antibody; 1: XXA-IL-27 (71 kD); 2: SUMO-IL-27 (66 kD); 3: GST-IL-27 (76 kD); 4: NusA-IL-27 (105 kD); 5: TrxA-IL-27 (66 kD); 6: MBP-IL-27 (91 kD); 7: IL-27 (54 kD); M: protein marker

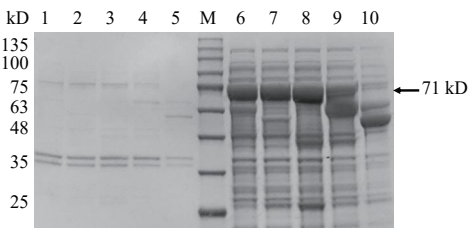
图6 Western blot鉴定表达产物

Fig. 6 Western blot identification of expressed products

2.5 分子伴侣共表达对IL-27表达水平的影响

将XXA-IL-27重组质粒与五套分子伴侣质粒分别共转化，诱导表达后进行SDS-PAGE分析，结果如图7所示。与pGro7（GroES-GroEL）共表达组的目的蛋白在上清中条带最为明显，其余四组条带较弱。

ELISA检测结果（图8-B）显示，pGro7共表达组的XXA-IL-27表达量最高，达46.4 mg/L；pG-KJE8组为23.6 mg/L，pKJE7组为20.7 mg/L，其余两组表达量均低于20 mg/L。



M:Protein marker;1:XXA-IL-27(pKJE7)胞内沉淀;2:XXA-IL-27(pTf16)胞内沉淀;3:XXA-IL-27(pGro7)胞内沉淀;4:XXA-IL-27(pG-KJE8)胞内沉淀;5:XXA-IL-27(pG-Tf2)胞内沉淀;6:XXA-IL-27(pKJE7)胞内上清;7:XXA-IL-27(pTf16)胞内上清;8:XXA-IL-27(pGro7)胞内上清;9:XXA-IL-27(pG-KJE8)胞内上清;10:XXA-IL-27(pG-Tf2)胞内上清

M: Protein marker; 1: XXA-IL-27 (pKJE7) intracellular pellet; 2: XXA-IL-27 (pTf16) intracellular pellet; 3: XXA-IL-27 (pGro7) intracellular pellet; 4: XXA-IL-27 (pG-KJE8) intracellular pellet; 5: XXA-IL-27 (pG-Tf2) intracellular pellet; 6: XXA-IL-27 (pKJE7) intracellular supernatant; 7: XXA-IL-27 (pTf16) intracellular supernatant; 8: XXA-IL-27 (pGro7) intracellular supernatant; 9: XXA-IL-27 (pG-KJE8) intracellular supernatant; 10: XXA-IL-27 (pG-Tf2) intracellular supernatant

图7 SDS-PAGE分析分子伴侣共表达对XXA-IL-27可溶性的影响

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of the effects of chaperone co-expression on XXA-IL-27 solubility

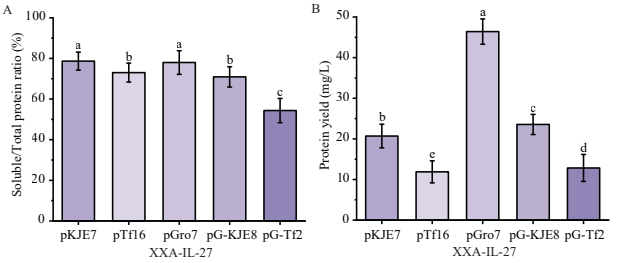
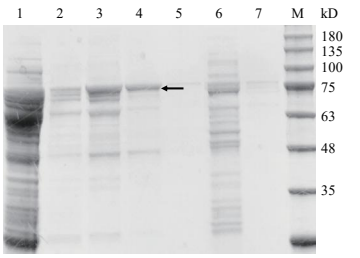


图8 不同分子伴侣与XXA-IL-27共表达时的可溶性灰度分析(A)与总表达量ELISA分析(B)

Fig. 8 Densitometric analysis of XXA-IL-27 solubility (A) and ELISA quantification of total expression levels (B) upon co-expressed with different chaperones

2.6 XXA-IL-27蛋白纯化与纯度分析

通过不同浓度的咪唑洗脱液进行梯度洗脱，收集含有目的蛋白的洗脱主峰，此时取少量未经浓缩的洗脱液进行SDS-PAGE分析验证纯度（图9）。随后，对收集到的高纯度蛋白液进行超滤浓缩与脱盐，经BCA法准确定量，最终获得的重组XXA-IL-27蛋白浓度为1.311 mg/mL，用于后续实验。



M:Protein marker;1:流穿液;2:20 mmol/L咪唑洗脱液;3:30 mmol/L咪唑洗脱液;4:75 mmol/L咪唑洗脱液;5:150 mmol/L咪唑洗脱液;6:300 mmol/L咪唑洗脱液;7:500 mmol/L咪唑洗脱液(未浓缩洗脱原液)

M: Protein marker; 1: flow-through; 2: 20 mmol/L imidazole; 3: 30 mmol/L imidazole; 4: 75 mmol/L imidazole; 5: 150 mmol/L imidazole; 6: 300 mmol/L imidazole; 7: 500 mmol/L imidazole (unconcentrated eluate)

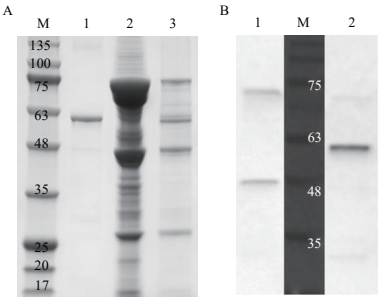
图9 rh XXA-IL-27纯化过程的SDS-PAGE分析

Fig. 9 SDS-PAGE analysis of rh XXA-IL-27 purification

2.7 TEV酶切去标签结果分析

XXA-IL-27融合蛋白经TEV蛋白酶切处理后的SDS-PAGE与Western blot分析结果（图10）显示，酶

切产物中仍存在与原融合蛋白分子量一致的条带，且在凝胶对应位置（理论分子量约20 kD处）未观察到明显的游离XXA标签条带。此外，在去除XXA标签的反应体系及后续浓缩过程中，观察到严重的蛋白聚集与沉淀现象，目的蛋白的最终回收率极低，未能获取足量、稳定的无标签IL-27蛋白。为最大程度保留蛋白的活性构象与可溶性状态，后续的细胞活性验证实验均直接采用纯化后的XXA-IL-27融合蛋白进行。



M：Protein marker；（A）1：TEV酶；2：XXA-IL-27酶切前；3：XXA-IL-27酶切后；（B）1：XXA-IL-27酶切前；2：XXA-IL-27酶切后

M: Protein marker; (A) 1: TEV protease; 2: XXA-IL-27 before cleavage; 3: XXA-IL-27 after cleavage; (B) 1: XXA-IL before cleavage; 2: XXA-IL after cleavage

图10　TEV酶切处理的SDS-PAGE（A）与Western blot（B）分析

Fig. 10　SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of TEV cleavage

2.8　rh XXA-IL-27对MCF-7细胞形态与增殖的抑制作用

显微镜观察结果显示，药物处理48 h后，对照组MCF-7细胞呈典型上皮样形态，贴壁生长良好（图11-A）。经不同浓度（5–30 μg/mL）XXA-IL-27处理后，细胞形态出现明显的浓度依赖性改变。与对照组相比，5 μg/mL XXA-IL-27处理组细胞开始收缩变圆，细胞间隙增大，贴壁细胞减少（图11-B）；当处理浓度升至30 μg/mL时，大部分细胞发生严重皱缩，出现大面积脱落，视野中漂浮的死亡细胞显著增多（图11-C）。

CCK-8检测结果表明，XXA-IL-27对MCF-7细胞增殖具有明显的抑制作用，且呈剂量依赖性。与对照组相比，当XXA-IL-27浓度≥5 μg/mL时，MCF-7细胞存活率显著下降。其中，20、25和30 μg/mL处理组的细胞存活率分别降至（25.3±0.9）%、（14.5±2.9）%和（6.4±2.8）%（图12-A）。对剂量–效应数据进行非线性拟合分析，计算得出XXA-IL-27作用于MCF-7细胞48 h的半数抑制浓度（IC_{50}）约为3.40 μg/mL（图12-B）。

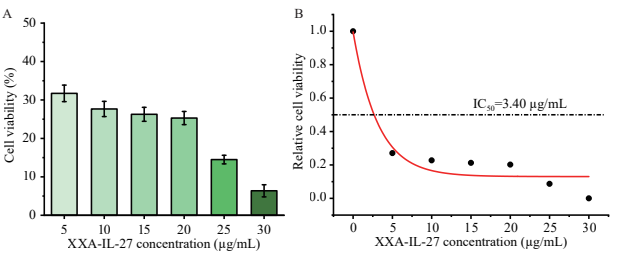


A：对照组；B：5 μg/mL处理组；C：30 μg/mL处理组

A: Control group; B: 5 μg/mL treatment group; C: 30 μg/mL treatment group

图11　XXA-IL-27处理48 h对MCF-7细胞形态的影响

Fig. 11　Effect of XXA-IL-27 treatment for 48 h on the morphology of MCF-7 cells



A：细胞存活率柱状图；B：剂量反应及IC_{50}拟合曲线

A: Bar chart of cell viability; B: dose-response profile and IC_{50} fitting curve

图12　XXA-IL-27对MCF-7细胞存活率的影响及IC_{50}测定

Fig. 12　Effect of XXA-IL-27 on MCF-7 cell viability and corresponding IC_{50} assessment

3　讨论

IL-27作为IL-12家族中具有重要免疫调节潜力的候选药物，其异源二聚体的复杂结构导致原核表达极易形成包涵体，长期以来依赖成本高昂的真核系统[16–18]。尽管引入（Gly_4Ser）$_3$柔性连接子构建单链融合蛋白是提升多亚基结构稳定性的已知途径，但此类复杂蛋白在大肠杆菌等原核宿主中表达时，极易发生错误折叠并形成不可逆的包涵体沉淀。本研究系统性引入多维度的促溶调控策略，利用XXA标签与pGro7（GroEL/ES）分子伴侣，成功在胞内实现了目的蛋白46.4 mg/L的高比例可溶表达。这一结果不仅避开了繁琐的包涵体变性复性过程，同时体外活性

实验证实该产物能有效抑制MCF-7乳腺癌细胞的增殖，确证了其良好的生物学活性，为复杂异源二聚体细胞因子的低成本原核表达提供了新的技术路径。

实验初期，未经修饰的IL-27在原核胞质内主要以无活性包涵体形式存在。根据Anfinsen热力学假说及其延伸的“折叠漏斗”模型，蛋白质的折叠本质上是自发趋向自由能最低天然构象的过程[19-20]，但在大肠杆菌胞质高度拥挤的微环境下，IL-27暴露的疏水区段在未完成整体折叠前便发生非特异性塌缩，陷入动力学陷阱，最终导致不可逆的聚集沉淀[21]。为攻克这一难题，本研究在N端引入了多种促溶标签，实验结果显示XXA标签介导的融合蛋白可溶性水平达到64.91%，显著优于GST、MBP及SUMO等传统标签。从分子机制分析，XXA标签作为一种高亲水性的蛋白质骨架，不仅在翻译起始阶段通过空间位阻效应降低了新生肽链间的非特异性碰撞，更重要的是，其表面的极性氨基酸残基能够招募水分子形成致密有序的水化层[10,22]。这有效屏蔽了IL-27内部的疏水斑点，通过降低体系自由能，为多肽链跨越折叠能垒寻获天然构象争取了关键的时间窗口[23]。这种“被动保护”机制是实现IL-27胞内可溶的前提。

进一步引入分子伴侣后发现，pGro7（GroEL-GroES系统）与XXA标签表现出显著的协同效应，将可溶性产率提升至46.4 mg/L。GroEL-GroES是一种由ATP驱动的I型分子伴侣纳米机器[24]。其作用机制为：GroEL形成双层14聚体桶状结构，其顶端结构域内部的疏水内壁能够精准识别并捕获暴露疏水表面的折叠中间态底物；随着ATP的结合，GroEL发生变构，促使GroES封闭桶口，引发内壁由疏水向亲水性翻转，同时空腔体积迅速膨胀，最终构建出与胞质隔离的封闭式折叠笼[25]。在此微环境中，IL-27得以进行无干扰的折叠探索，从而显著缓解了异源蛋白过量表达带来的胞内折叠压力[26]。当ATP水解后，GroES与底物一同被释放；若蛋白仍未正确折叠，则进入下一轮循环。在本研究中，XXA标签的“被动防御”与GroEL/ES系统介导的“主动重塑”在时序与空间上形成了较为紧密的协同，该策略在一定程度上突破了原核系统表达复杂异源二聚体细胞因子时面临的折叠物理极限，为难溶性重组药用蛋白的高效制备提供了有参考价值的新范式。

在Western blot检测中，结果显示产物中观察到少量的截短条带，这主要是由于融合蛋白内部的柔性连接子较易受到宿主内源性蛋白酶的降解，加之高压破碎过程中的物理剪切作用共同导致[27]。在随后的纯化与稳定性评价阶段，实验发现切除XXA标签，会导致IL-27发生不可逆的聚集沉淀。这表明在本研究的单链表达体系中，XXA标签不仅是辅助折叠的工具，更是维持蛋白热力学稳定性的必要组分，其通过掩盖局部疏水斑点极大地提高了融合蛋白的溶解上限[28]，因此在最终产物中予以保留。尽管保留XXA标签（约17 kD）可能带来一定的空间位阻，导致其实际效价较天然IL-27略低，但ELISA和体外实验共同证实，经Ni-NTA亲和层析获取的rh XXA-IL-27依然具备良好的特异性抗原识别能力，并能有效抑制MCF-7细胞的增殖（IC_{50}=3.40 μg/mL）。其典型的剂量依赖性抑制曲线充分确证了该融合蛋白具有正确的空间构象，同时也再次印证了糖基化修饰并非该细胞因子发挥体外抑癌活性的绝对必要条件[7,29]，这与近年来关于IL-27通过激活特定信号通路抑制乳腺癌进展的研究结果一致[30]。

综上所述，本研究建立的“促溶标签–分子伴侣”协同表达策略，有效攻克了重组人IL-27异源表达极易形成包涵体的瓶颈，为复杂多结构域细胞因子的原核制备提供了新技术路径。针对目前产物存在的局限，后续研究将重点通过工艺优化（如多级层析工艺优化与引入蛋白酶抑制剂）进一步提升制备纯度。同时，研究尺度将由体外评价延伸至实体瘤动物模型的体内实验，系统评估非糖基化rh IL-27的体内药效、免疫激活机制及药代动力学特征，以期为其标准化制备及潜在的临床转化奠定更为坚实的基础。

4 结论

通过筛选多种促溶标签及分子伴侣，发现XXA标签联合pGro7伴侣系统效果最佳，使rh IL-27可溶性表达比例达64.91%，产量升至46.4 mg/L。纯化产物经Western blot验证正确，且能有效抑制MCF-7细胞增殖（IC_{50}=3.40 μg/mL）。该策略成功实现了活性rh IL-27的高效制备。

文章所有附图附表请点击链接查看（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260708173338_NewsFile_47.pdf）。

参考文献

[1] Pflanz S, Timans JC, Cheung J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI_3 and p28 protein, induces proliferation of naive $CD4^+$ T cells [J]. Immunity, 2002, 16(6): 779-790.

[2] Maleki AH, Rajabivahid M, Khosh E, et al. Harnessing IL-27: challenges and potential in cancer immunotherapy [J]. Clin Exp Med, 2025, 25: 34.

[3] Kourko O, Seaver K, Odoardi N, et al. IL-27, IL-30, and IL-35: a cytokine triumvirate in cancer [J]. Front Oncol, 2019, 9: 969.

[4] Matsui M, Kishida T, Nakano H, et al. Interleukin-27 activates natural killer cells and suppresses NK-resistant head and neck squamous cell carcinoma through inducing antibody-dependent cellular cytotoxicity [J]. Cancer Res, 2009, 69(6): 2523-2530.

[5] Martin AK, Hedberg J, Hernandez-Aguirre I, et al. Oncolytic HSV-IL27 expression improves CD8 T cell function and therapeutic activity in syngeneic glioma models [J]. J Immunother Cancer, 2025, 13(7): e012227.

[6] Sørensen HP, Mortensen KK. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* [J]. Microb Cell Fact, 2005, 4: 1.

[7] Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges [J]. Front Microbiol, 2014, 5: 172.

[8] Francis DM, Page R. Strategies to optimize protein expression in *E. coli* [J]. CP Protein Science, 2010, 61(1): 5.24.1-29.

[9] Ghosh S, Rasheedi S, Rahim SS, et al. Method for enhancing solubility of the expressed recombinant proteins in *Escherichia coli* [J]. BioTechniques, 2004, 37(3): 418-423.

[10] Costa S, Almeida A, Castro A, et al. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system [J]. Front Microbiol, 2014, 5: 63.

[11] Liu ZH, Huang D, Fu XJ, et al. Comparison of three commonly used fusion tags for the expression of nanobodies in the cytoplasm of *Escherichia coli* [J]. Biotechnol Biotechnol Equip, 2018, 32(2): 462-469.

[12] Marblestone JG, Edavettal SC, Lim Y, et al. Comparison of *SUMO* fusion technology with traditional gene fusion systems: Enhanced expression and solubility with *SUMO* [J]. Protein Sci, 2006, 15(1): 182-189.

[13] Steinmetz EJ, Auldridge ME. Screening fusion tags for improved recombinant protein expression in *E. coli* with the expresso® solubility and expression screening system [J]. CP Protein Science, 2017, 90(1): 5.27. 1-20.

[14] Chen SM, Shan B, Luo YC, et al. Molecular chaperone effects on recombinant yield and binding characteristics of an ABA-specific scFv in *Escherichia coli* [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2025, 13: 1643833.

[15] Xie X, Wu P, Huang XC, et al. Retro-protein XXA is a remarkable solubilizing fusion tag for inclusion bodies [J]. Microb Cell Fact, 2022, 21: 51.

[16] Hunter CA, Kastelein R. Interleukin-27: balancing protective and pathological immunity [J]. Immunity, 2012, 37(6): 960-969.

[17] Baghban R, Farajnia S, Rajabibazl M, et al. Yeast expression systems: overview and recent advances [J]. Mol Biotechnol, 2019, 61(5): 365-384.

[18] McKenzie EA, Abbott WM. Expression of recombinant proteins in insect and mammalian cells [J]. Methods, 2018, 147: 40-49.

[19] Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains [J]. Science, 1973, 181(4096): 223-230.

[20] Dill KA, MacCallum JL. The protein-folding problem, 50 years on [J]. Science, 2012, 338(6110): 1042-1046.

[21] Vallejo LF, Rinas U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins [J]. Microb Cell Fact, 2004, 3: 11.

[22] Paraskevopoulou V, Falcone F. Polyionic tags as enhancers of protein solubility in recombinant protein expression [J]. Microorganisms, 2018, 6(2): 47.

[23] Kim YE, Hipp MS, Bracher A, et al. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis [J]. Annu Rev Biochem, 2013, 82: 323-355.

[24] Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(10): 630-642.

[25] Hayer-Hartl M, Bracher A, Hartl FU. The GroEL-GroES chaperonin machine: a nano-cage for protein folding [J]. Trends Biochem Sci, 2016, 41(1): 62-76.

[26] Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FU. *In vivo* aspects of protein folding and quality control [J]. Science, 2016, 353(6294): aac4354.

[27] Chen XY, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers: Property, design and functionality [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2013, 65(10): 1357-1369.

[28] Waugh DS. Making the most of affinity tags [J]. Trends Biotechnol, 2005, 23(6): 316-320.

[29] Scapin G, Cagdas E, Grav LM, et al. Implications of glycosylation for the development of selected cytokines and their derivatives for medical use [J]. Biotechnol Adv, 2024, 77: 108467.

[30] Yap WB, Nadarajah S, Shidik N, et al. Cytotoxicity, regulation of apoptotic and anti-apoptotic gene expression by IL-27 in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines [J]. J Sains Kesihatan Malays, 2018, 16: 15-22.

（责任编辑　朱琳峰）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):328-339

肠道菌群代谢产物TMAO介导氧化应激通路在腹泻发病中的作用机制

方乐瑶[1] 彭买姣[2] 惠华英[2] 谭周进[1*]
（1.湖南中医药大学中医学院，长沙 410208；2.湖南中医药大学药学院，长沙 410208）

摘 要： 【目的】探究肠道菌群代谢产物氧化三甲胺（trimethylamine N-oxide, TMAO）调节氧化应激通路在腹泻发病中的作用机制。【方法】将40只小鼠随机分为正常组、模型组、TMAO抑制剂组及TMAO抑制剂+模型组，评估小鼠一般状态及粪便，观察结肠和肾组织病理变化，检测胆碱三甲胺裂解酶（choline trimethylamine-lyase, CutC）活性、三甲胺（trimethylamine, TMA）与TMAO、去乙酰化酶3（sirtuin 3, SIRT3）与超氧化物歧化酶2（superoxide dismutase 2, SOD2）蛋白、SOD活性及活性氧（reactive oxygen species, ROS），分析盲肠内容物菌群。【结果】与正常组比较，模型组小鼠粪便含水率极显著升高（$P<0.001$）；TMAO抑制剂+模型组小鼠粪便含水率较模型组显著降低（$P<0.05$）。与正常组比，模型组结肠、肾组织及血清TMAO均显著升高。与正常组比较，模型组和TMAO抑制剂+模型组结肠与肾组织中SIRT3及SOD2表达减少，SOD活性降低；然而，TMAO抑制剂+模型组小鼠结肠SIRT3和SOD2表达显著高于模型组（$P<0.05$），肾脏SIRT3和SOD2表达亦较模型组极显著升高（$P<0.01$）。与正常组比较，模型组及TMAO抑制剂+模型组小鼠结肠组织中ROS水平极显著升高（$P<0.01$）；模型组肾组织ROS极显著升高（$P<0.001$），TMAO抑制剂+模型组小鼠肾组织ROS水平显著升高（$P<0.01$）。TMAO抑制剂可提高模型小鼠肠道菌群的物种丰富度和多样性，重塑菌群结构。相关性分析表明，TMAO与ROS呈正相关，与SOD呈负相关；模型组特征菌属*Streptococcus*与TMAO、ROS呈正相关，与SOD呈负相关；而TMAO抑制剂+模型组特征菌属*Bilophila*与TMAO和ROS呈负相关。【结论】TMAO通过抑制SIRT3及SOD2表达，促进ROS积累并加重氧化应激反应，从而参与腹泻的发生发展。

关键词： 腹泻；肠道菌群；氧化三甲胺；氧化应激
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0149

Mechanism of the Oxidative Stress Pathway Mediated by the Gut Microbiota Metabolite TMAO in the Pathogenesis of Diarrhea

FANG Le-yao[1] PENG Mai-jiao[2] HUI Hua-ying[2] TAN Zhou-jin[1*]
（1. *School of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha* 410208; 2. *School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha* 410208）

Abstract: 【Objective】 To investigate the role of the gut microbiota-derived metabolite trimethylamine N-oxide (TMAO) in modulating oxidative stress pathways during diarrhea. 【Method】 Forty mice were randomly divided into a normal group, a model group, a TMAO inhibitor group, and a TMAO inhibitor + model group. The general status and fecal condition of the mice were evaluated, and histopathological changes in the colon and kidney tissues were observed. The choline trimethylamine-lyase (CutC), trimethylamine (TMA) and TMAO, sirtuin 3 (SIRT3) and superoxide dismutase 2 (SOD2), SOD, and reactive oxygen species (ROS) were measured. Additionally, changes in the cecal microbiota were analyzed. 【Result】 Compared with the normal group, the model group showed an extremely significant increase in fecal moisture content ($P<0.001$), the fecal moisture content in the TMAO inhibitor + model group mice was significantly reduced compared to the model group ($P<0.05$). Compared with the normal group, TMAO levels in the colon, kidney tissue, and serum were significantly elevated in the model group. In

收稿日期：2026-01-30
基金项目：国家自然科学基金面上项目（82575001）
*通信作者：谭周进 tanzhjin@sohu.com

addition, compared with the normal group, both the model group and the TMAO inhibitor + model group exhibited decreased expression of SIRT3 and SOD2 and reduced SOD activity in the colon and kidney tissues. However, the expression of SIRT3 and SOD2 in the colon of the TMAO inhibitor + model group was significantly higher than that in the model group (P<0.05), and their expression in the kidney was also significantly increased compared with the model group (P<0.01). ROS levels in the colon tissue of the model group and the TMAO inhibitor + model group were significantly increased (P<0.01), while ROS levels in the kidney tissue were extremely significantly increased in the model group (P<0.001) and significantly increased in the TMAO inhibitor + model group (P<0.01). TMAO inhibitor treatment increased the species richness and diversity of the gut microbiota in model mice and remodeled the microbial community structure. Correlation analysis showed that TMAO was positively correlated with ROS and negatively correlated with SOD. In the model group, the characteristic genus *Streptococcus* was positively correlated with TMAO and ROS and negatively correlated with SOD, whereas in the TMAO inhibitor + model group, the characteristic genus *Bilophila* was negatively correlated with TMAO and ROS. 【Conclusion】 TMAO participates in the occurrence and development of diarrhea by inhibiting the expression of SIRT3 and SOD2, promoting ROS accumulation, and exacerbating oxidative stress.

Keywords: diarrhea; gut microbiota; trimethylamine N-oxide; oxidative stress

腹泻是临床常见的消化系统症状，表现为排便次数增多、粪便性状改变。肠道菌群稳态是维持肠道屏障功能的重要基础，肠道菌群失衡可通过代谢产物异常、免疫调节紊乱等途径破坏屏障完整，引发肠道炎症反应[1]。在中医学中，腹泻称为泄泻，肾阳亏虚证为其常见证型。肾阳亏虚证泄泻模型小鼠中肠道屏障与肾功能损伤常同时存在，提示肠–肾功能互作在其病理过程中可能发挥关键作用[2]。肠道菌群代谢产物是介导微生态与宿主器官互作的重要分子[3-4]。氧化三甲胺（trimethylamine N-oxide, TMAO）是肠道菌群将膳食胆碱、肉碱等底物转化为三甲胺（trimethylamine, TMA）后，经肝脏黄素单加氧酶3氧化生成的代谢产物[5]。TMAO作为肠源性代谢产物参与全身炎症，损害肠道和肾脏功能。研究显示，TMAO水平升高与肾脏损伤呈正相关[6]。慢性肾病患者肠道菌群紊乱导致TMAO蓄积，可破坏肠道屏障，加剧炎症反应[7-8]。课题组前期研究发现肾阳亏虚证泄泻小鼠中TMAO水平显著升高，TMAO可激活炎症小体，诱导促炎细胞因子释放，导致结肠和肾组织炎症损伤[9]。因此，TMAO作为连接肠道与肾脏的重要代谢信号，可能通过“肠–肾轴”影响肾阳亏虚证泄泻的病理过程。

氧化应激是机体在病理状态下活性氧（reactive oxygen species, ROS）生成过度的状态，是炎症与组织损伤的重要机制。肠道组织中丙二醛、ROS等升高不仅能破坏上皮屏障完整，还可激活炎症相关信号通路，加重肠道炎症。肠道菌群及其代谢产物还可调控宿主氧化应激，影响器官间信号传递[10-12]。氧化应激同样是多种肾脏疾病的重要环节。TMAO能促进ROS生成并诱发氧化应激，引起肾组织损伤[13-14]。研究表明，TMAO可抑制线粒体去乙酰化酶3（sirtuin 3, SIRT3）表达，下调超氧化物歧化酶2（superoxide dismutase 2, SOD2），导致线粒体ROS增加，抗氧化能力下降[15-16]。SIRT3和SOD2在维持细胞氧化还原稳态中发挥关键作用，其表达受抑制可导致ROS堆积，加剧炎症反应并破坏组织结构[17-18]。因此，TMAO作为肠–肾轴的重要信号分子，可能通过SIRT3-SOD2-ROS通路介导氧化应激与炎症反应，从而在肾阳亏虚证泄泻的病理过程中发挥核心作用。

基于此，本研究复制肾阳亏虚证泄泻小鼠模型，并予以TMAO抑制剂干预，评估小鼠一般特征，观察结肠及肾组织的形态，检测TMA、TMAO水平及胆碱三甲胺裂解酶（choline trimethylamine-lyase, CutC）活性，测定结肠及肾组织中SIRT3与SOD2表达、总SOD活性以及ROS水平，并通过16S rRNA测序分析盲肠内容物菌群变化，旨在揭示TMAO介导的氧化应激在肠–肾交互作用中的机制，探究肾阳亏虚证泄泻的病理机制。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物及饲养环境　选用18–22 g昆明SPF级小鼠（购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物质量合格证号：ZS-202406250002），为避免性别差异对肠道菌群的干扰，统一采用雄性小鼠[19]。

动物饲养于湖南中医药大学实验动物中心（许可证编号：SYXK（湘）2019-0009），饲养环境条件为室温23–25 ℃、相对湿度50%–70%、12 h光暗循环，自由饮食饮水，饲料由北京华阜康生物科技股份有限公司提供。本研究已通过湖南中医药大学动物伦理委员会审批，实验过程符合动物伦理规定（伦理编号：HNUCM21-2409-13）。

1.1.2 药物和试剂盒 腺嘌呤（德国biofroxx，货号：1163GR025），纯度≥99%。番泻叶（批号：2311300022）购自亳州市沪谯药业有限公司。3,3-二甲基-1-丁醇（3, 3-Dimethyl-1-butanol, DMB）购自Sigma-Aldrich（货号：183105）。TMAO（货号：JM-11747M1）和TMA（货号：JM-11998M1）试剂盒购自江苏晶美生物科技有限公司；SOD（货号：ADS-W-KYO11）和ROS（货号：ADS-W-YH009）试剂盒购自江苏艾迪生生物科技有限公司；小鼠单抗β-Actin（货号：66009-1-Ig）、兔多抗SIRT3（货号：10099-1-AP）以及兔多抗SOD2（货号：24127-1-AP）购自武汉三鹰生物技术有限公司；HRP标记羊抗小鼠二抗（货号：BA1051）和羊抗兔二抗（货号：BA1054），购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.1.3 药物制备 腺嘌呤混悬液制备：称取适量腺嘌呤，溶于无菌水中，配制成浓度为5 mg/mL腺嘌呤混悬液，现配现用，避光，灌胃前根据小鼠实际体质量进行换算。番泻叶水煎液的制备：称取适量的番泻叶，加入5倍药材体积的水浸泡30 min后用纱布过滤，滤液75 ℃水浴蒸发浓缩成生药浓度为1 g/mL的水煎液，4 ℃冰箱保存备用，灌胃前根据小鼠实际体质量进行换算。DMB饮水溶液制备：配制浓度为1%的DMB饮用水溶液，现配现用，避光。

1.2 方法

1.2.1 造模方法及模型评价 按照课题组造模方法复制肾阳亏虚证泄泻模型，造模周期共计14 d，具体方案如下：第1–14天使用腺嘌呤混悬液（50 mg/kg）灌胃，1次/d [20]；第8–14天在上述基础上灌胃番泻叶水煎液（10 g/kg），1次/d。根据肾阳亏虚证泄泻的辨证要点，拟定肾阳亏虚证泄泻模型评价标准，造模期间观察并记录小鼠行为学改变、体质量、肛温及腹泻情况（粪便形态、粪便含水率），结合肠、肾组织病理变化等指标对模型进行评估 [2]。

1.2.2 实验动物分组与处理 40只小鼠适应性喂养3 d后，按随机数字表法分为正常组（CC组，n=10）、模型组（CM组，n=10）、TMAO抑制剂组（CY组，n=10）及TMAO抑制剂+模型组（CMY组，n=10）。CM组：灌胃腺嘌呤混悬液及番泻叶水煎液，周期14 d。CMY组：灌胃腺嘌呤混悬液及番泻叶水煎液，同时每日饮用DMB溶液替代日常饮水，周期14 d。CY组：每日饮用DMB溶液替代日常饮水，持续14 d。CC组：灌胃等量无菌水。

1.2.3 小鼠一般特征 观察小鼠行为学改变及粪便形态，收集小鼠粪便，称取湿重后置于110 ℃烘箱中干燥至恒重，称记干重，粪便含水率（%）=（湿重–干重）/湿重×100%。测量肛温和体质量，体质量变化率（%）=（实验后体质量–实验前体质量）/实验前体质量×100%。

1.2.4 组织形态学检测 将采集的小鼠结肠与肾脏组织置于4%多聚甲醛固定液中固定，按常规步骤进行梯度乙醇脱水、二甲苯透明和石蜡包埋。制备石蜡切片后进行苏木精–伊红染色，再经梯度乙醇脱水、二甲苯透明，最后用中性树胶封片，光学显微镜下观察结肠及肾脏组织形态变化。

1.2.5 酶联免疫吸附实验 收集小鼠血液、结肠和肾脏组织样本。取血清样本，检测血清TMAO、TMA水平。取结肠、肾脏样本用组织研磨仪研磨，4 ℃ 3 000 r/min离心10 min，取上清液检测结肠、肾脏组织中TMAO含量。按照试剂盒说明书分别进行加样、加酶、孵育、洗板、显色、终止反应，使用酶标仪检测OD值，绘制标准曲线。

1.2.6 CutC活性测定 采用苦味酸–甲苯法 [21] 在410 nm波长处测定CutC活性。该方法基于CutC催化胆碱生成TMA，TMA与苦味酸反应生成黄色的苦味酸三甲胺盐，该产物在410 nm处具有吸收峰。通过测定溶液在410 nm处的吸光度，结合标准曲线对TMA进行定量，计算CutC活性 [22–23]。无菌条件下收集小鼠的结肠和盲肠内容物，装入无菌离心管中，按质量比1∶6加入无菌水，涡旋振荡5 min，4 ℃、3 000 r/min离心15 min，取上清作为粗酶液备用。取0.1 mL待测样品粗酶液于5 mL离心管中，依次加入20 mmol/L氯化胆碱溶液0.5 mL和PBS溶液0.5 mL，将离心管放入厌氧培养袋中，将厌氧培养袋置于

37 ℃水浴反应12 h。向各离心管中加入1%甲酸100 μL、10%甲醛溶液100 μL、无水甲苯1.5 mL、25%氢氧化钾溶液250 μL，涡旋10 s，30 ℃水浴5 min，涡旋1 min，静置10 min。吸取600 μL上层甲苯到装有0.1 g无水硫酸钠的2 mL离心管中，振荡10 s，静置脱水。1%甲酸灭活的粗酶液为空白对照。取96孔板，每孔加入脱水后的甲苯层100 μL，再加入0.02%苦味酸甲苯溶液100 μL，酶标仪设定振荡5 s，在410 nm测定吸光度。上述实验步骤重复3次。

1.2.7　Western blot检测结肠和肾脏组织SIRT3、SOD2　取少量剪碎的结肠或肾脏组织，加入裂解液，匀浆后于冰上放置30 min充分裂解。随后在4 ℃、12 000 r/min离心5 min，取上清分装入离心管中于-20 ℃保存。将蛋白样品与上样缓冲液混合后于沸水中变性。采用BCA法测定蛋白浓度，之后依次进行上样、电泳、转膜及封闭。将PVDF膜与一抗于4 ℃孵育过夜，洗膜后于室温下加入HRP标记的二抗孵育2 h，再次洗膜。采用ECL化学发光试剂显色，并对蛋白条带灰度值进行分析。

1.2.8　结肠和肾脏组织总SOD活性和ROS水平测定　采用WST-8法检测结肠和肾脏组织总SOD活性，取0.1 g组织样品，加入1 mL提取液，冰浴匀浆，12 000 r/min离心10 min，收集上清液待测。按照说明书严格加入各试剂和样品，充分混匀，25 ℃避光静置30 min，450 nm测定各孔OD值，计算抑制百分率和总SOD活性。采用荧光法测定ROS水平，取0.1 g组织样品，加入1 mL提取液，冰浴匀浆，12 000 r/min离心10 min，收集上清液。按照说明书严格加入各试剂和样品，充分混匀，37 ℃避光孵育30 min后于激发波长488 nm，发射波长525 nm处读取荧光值F，计算ROS水平。

1.2.9　小鼠肠道菌群检测　因产生TMA的主要部位在盲肠，故取盲肠内容物测序[24]。无菌条件下采集盲肠内容物。将样品分别装入1.5 mL灭菌离心管中，-80 ℃冰箱保存[25]。试剂盒（Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA, D5635-02）提取核酸，采用琼脂糖凝胶电泳判断分子大小，利用Nanodrop（Thermo Scientific, Waltham, MA, USA, NC2000）对DNA进行定量测定。正向引物338F（5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3′）和反向引物806R（5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′）用于细菌16S rRNA基因的高变区V3–V4的PCR扩增。在Illumina NovaSeq（PE250双端测序）仪器上进行双端测序。测序由上海派森诺生物科技有限公司完成。

1.2.10　生物信息学分析

（1）多样性分析。计算Chao1、Shannon指数等评价Alpha多样性。采用主坐标分析（principal coordinates analysis, PCoA）与非度量多维尺度法（non-metric multidimensional scaling, NMDS）评价Beta多样性，采用Anosim进行组间差异分析。

（2）菌群优势物种分析。用ASV结果统计各分类水平物种组成。采用QIIME2筛选门水平及属水平丰度排名前10的优势菌门（属）[26]。

（3）菌群差异物种分析。采用线性判别分析效应量（linear discriminant analysis effect size, LEfSe）筛选标志物种。线性判别分析（linear discriminant analysis, LDA）量化差异物种的效应强度，设定LDA score>2。受试者工作特征（receiver operating characteristic, ROC）曲线通过计算敏感性与特异性，曲线下面积（area under the curve, AUC）>0.7判定具有诊断价值，评估标志物种的分类效能。

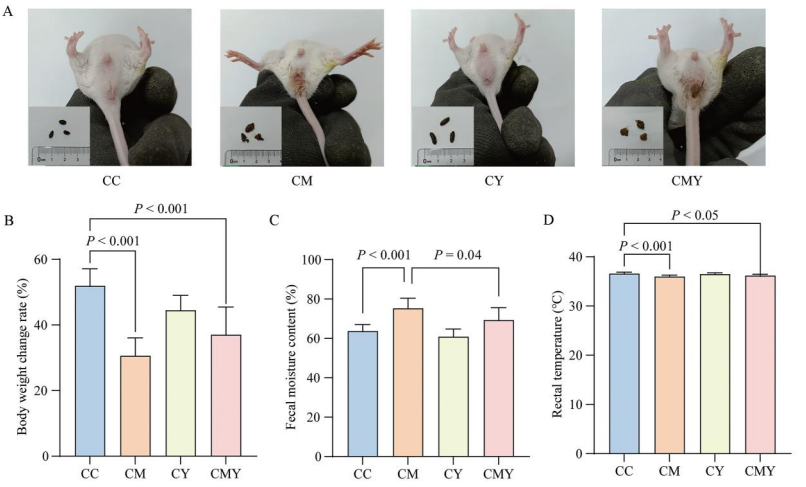
1.2.11　相关性分析　利用相关系数分析TMAO、TMA、SOD及ROS与特征菌属的相关性。

1.2.12　统计学分析　采用GraphPad Prism 9.0软件进行数据处理和统计分析。各组所得数据以平均值±标准差（mean±SD）表示。当数据符合正态性及方差齐性时，多组间比较采用单因素方差分析，事后检验采用LSD法。当不满足正态性和方差齐性时，多组间比较采用Kruskal-Wallis H检验。当P<0.05时差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　TMAO抑制剂对小鼠一般特征的影响

正常组及TMAO抑制剂组小鼠精神状态良好，反应灵活，粪便形态正常，肛周洁净。而模型组和TMAO抑制剂+模型组小鼠自主活动减少，粪便松散、不成形，肛周洁净度差（图1-A）。与正常组相比，模型组和TMAO抑制剂+模型组小鼠体质量极显著降低（P<0.001）（图1-B）。模型组粪便含水率较正常组极显著增加（P<0.001），而TMAO抑制剂+模型组粪便含水率较模型组显著降低（P<0.05）



A:粪便形态及肛周情况;B:体质量变化率;C:粪便含水率;D:肛温。数据采用平均值±标准差表示。CC:正常组,CM:模型组,CY:TMAO抑制剂组,CMY:TMAO抑制剂+模型组,下同

A: Fecal morphology and perianal condition. B: Body weight change rate. C: Fecal moisture content. D: Rectal temperature. Data are presented as mean ± standard deviation. CC: Control group; CM: Model group; CY: TMAO inhibitor group; CMY: TMAO inhibitor + model group, the same below

图1 各组小鼠的一般特征

Fig. 1 General characteristics of mice in each group

(图1-C)。与正常组相比，模型组小鼠肛温极显著降低（P<0.001），TMAO抑制剂+模型组肛温显著降低（P<0.05）(图1-D)。

2.2 TMAO抑制剂对小鼠结肠及肾脏组织的影响

正常组小鼠肠道组织隐窝和黏膜结构完整。模型组小鼠结肠组织切片可见广泛炎性细胞浸润，腺体结构紊乱，杯状细胞减少。TMAO抑制剂组隐窝和黏膜结构较完整，未见明显炎性细胞浸润。TMAO抑制剂+模型组小鼠腺体结构紊乱，可见散在炎性细胞浸润，范围较模型组缩小，杯状细胞减少（图2-A)。

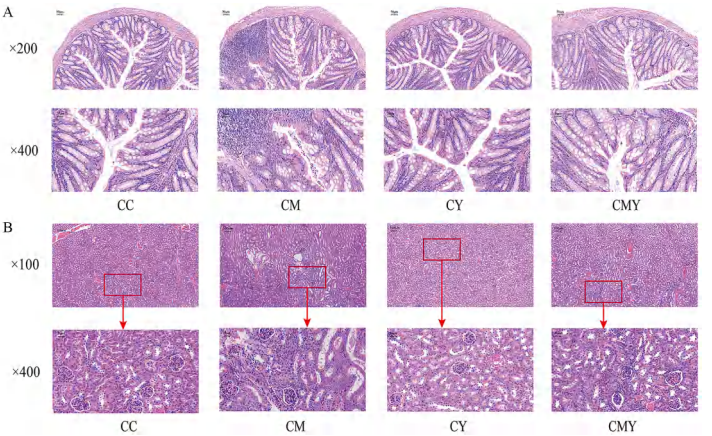
小鼠的肾脏切片中，正常组和TMAO抑制剂组小鼠肾小球体积正常，肾小管无管腔扩张，间质未见炎性细胞浸润。模型组小鼠肾小球形态不规则，肾小管明显扩张，管腔变大，管壁变性水肿，间质见大量炎性细胞浸润。TMAO抑制剂+模型组小鼠肾小球萎缩，肾小管扩张，间质炎性细胞浸润程度较模型组减轻（图2-B)。

2.3 各组小鼠TMAO相关指标的变化

与正常组相比，模型组及TMAO抑制剂+模型组结肠内容物CutC活性极显著升高（P<0.001）(图3-A)；与正常组相比，模型组及TMAO抑制剂+模型组盲肠内容物CutC活性均极显著升高（P<0.001），TMAO抑制剂+模型组盲肠内容物CutC活性低于模型组（P<0.01）(图3-B)。与正常组相比，模型组血清TMA含量显著升高（P<0.05）(图3-C)。与正常组相比，模型组结肠组织TMAO含量显著升高（P<0.01），而TMAO抑制剂+模型组结肠TMAO含量未显著升高（P>0.05）(图3-D)；模型组肾脏组织TMAO含量极显著升高（P<0.001），TMAO抑制剂+模型组肾脏组织TMAO含量显著升高（P<0.05）(图3-E)；模型组血清TMAO水平极显著升高（P<0.001），TMAO抑制剂+模型组血清TMAO水平显著升高（P<0.01）(图3-F)。TMAO抑制剂组结肠、肾脏及血清TMAO含量均显著低于正常组。

2.4 TMAO抑制剂对模型小鼠SIRT3-SOD2-ROS通路的影响

2.4.1 各组小鼠结肠及肾脏组织SIRT3与SOD2蛋白表达 与正常组相比，模型组及TMAO抑制剂+模型组小鼠结肠组织SIRT3和SOD2蛋白的相对表达水平均极显著降低（P<0.001），但TMAO抑制剂+模型组结肠SIRT3及SOD2蛋白表达均显著高于模型组（P<0.05）(图4-A)。与正常组相比，模型组及TMAO抑制剂+模型组小鼠肾脏组织中SIRT3蛋白和SOD2蛋白的相对表达水平极显著降低（P<0.001）；与模型

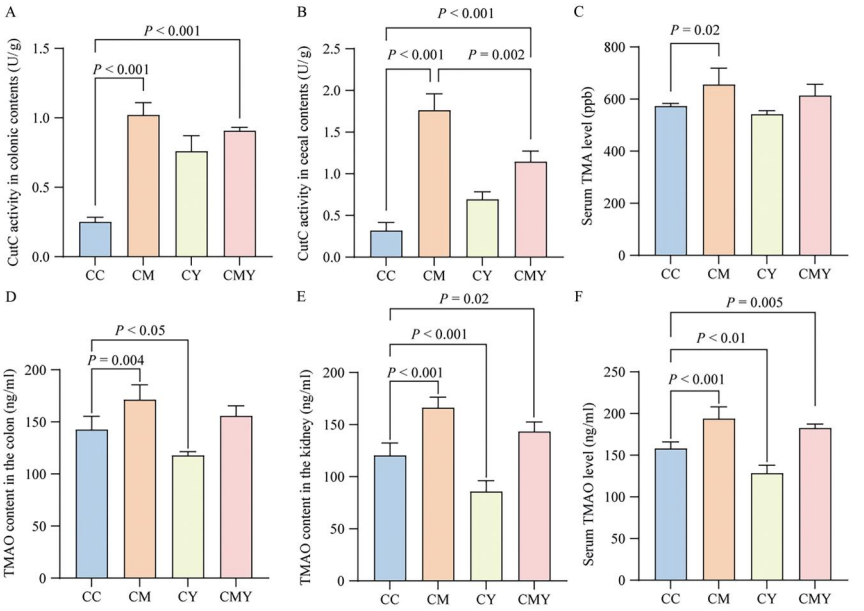


A：HE染色的结肠切片代表性图片（×200，×400）；B：HE染色的肾脏切片代表性图片（×100，×400）

A: Representative images of HE-stained colon sections (×200, ×400). B: Representative images of HE-stained kidney sections (×100, ×400)

图2　结肠及肾脏组织病理切片

Fig. 2　Hematoxylin and eosin staining of colon and kidney tissues



A：结肠内容物CutC；B：盲肠内容物CutC；C：血清TMA；D：结肠TMAO；E：肾脏TMAO；F：血清TMAO

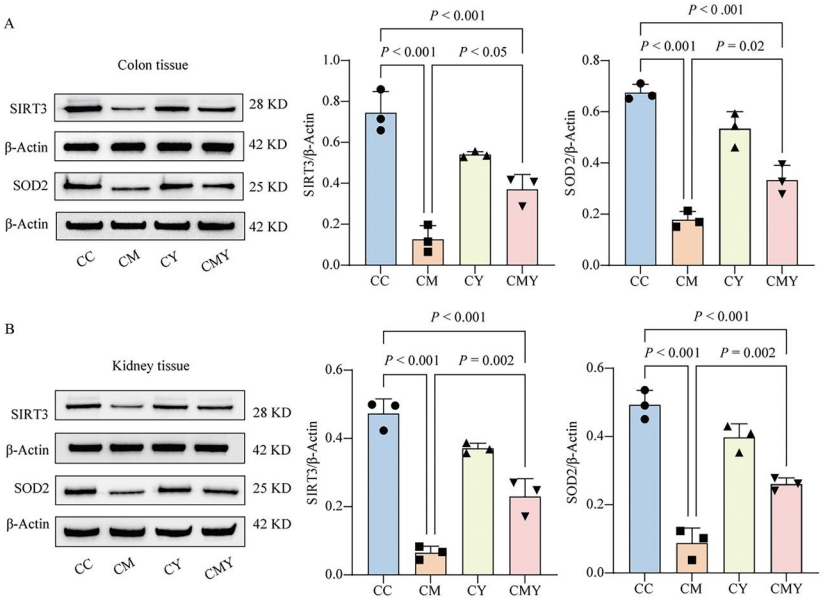
A: CutC activity in colonic contents. B: CutC activity in cecal contents. C: Serum TMA level. D: TMAO content in the colon. E: TMAO content in the kidney. F: Serum TMAO level

图3　各组小鼠TMAO相关指标变化

Fig. 3　Changes in TMAO-related parameters in mice from different groups

组相比，TMAO抑制剂+模型组肾脏SIRT3及SOD2蛋白表达均显著升高（P<0.01）（图4-B）。TMAO抑制剂组结肠及肾脏组织SIRT3与SOD2蛋白与正常组相比无显著变化。

2.4.2　各组小鼠结肠及肾脏组织SOD活性及ROS水平变化　与正常组相比，模型组小鼠结肠组织中SOD活性极显著降低（P<0.001），TMAO抑制剂+模型组结肠组织SOD活性显著降低（P<0.05）（图5-A）；模型组及TMAO抑制剂+模型组小鼠肾脏组织中SOD活性显著下降（P<0.01）（图5-B）。与正常组相比，模型组及TMAO抑制剂+模型组小鼠结肠组织中ROS水平显著升高（P<0.01）（图5-C）；模型组



A:结肠组织SIRT3及SOD2蛋白的表达;B:肾脏组织SIRT3及SOD2蛋白的表达

A: Expression of SIRT3 and SOD2 proteins in colon tissue. B: Expression of SIRT3 and SOD2 proteins in kidney tissue

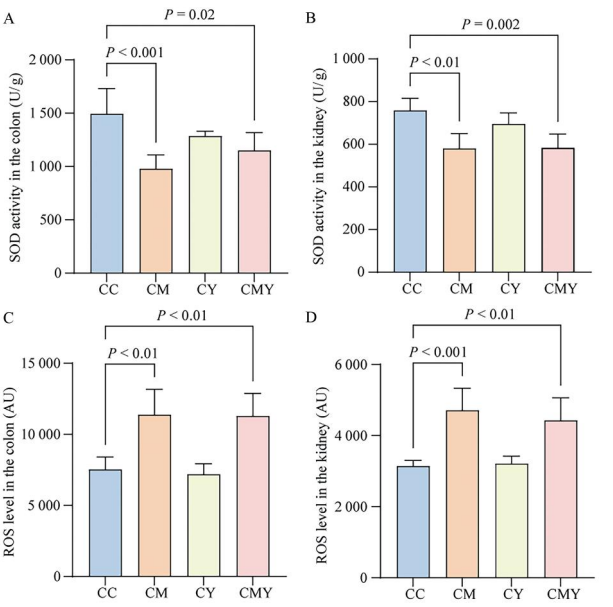
图4 结肠及肾脏组织SIRT3及SOD2蛋白的表达

Fig. 4 Protein expression of SIRT3 and SOD2 in colon and kidney tissues

小鼠肾脏组织中ROS水平极显著升高（P<0.001），TMAO抑制剂+模型组小鼠肾脏组织ROS水平亦显著升高（P<0.01）（图5-D）。TMAO抑制剂组结肠及肾脏组织SOD活性及ROS水平与正常组相比无明显变化。

2.5 TMAO抑制剂对小鼠肠道菌群结构与功能的影响

2.5.1 盲肠内容物菌群多样性的变化 与正常组相比，模型组Chao1指数极显著下降（P<0.001），TMAO抑制剂+模型组Chao1指数显著下降（P<0.05）（图6-A）；与正常组相比，模型组及TMAO抑制剂+模型组Shannon指数显著下降（P<0.01）（图6-B）；模型组Observed species显著低于正常组（P<0.01），TMAO抑制剂+模型组Observed species指数也低于正常组（P<0.05）（图6-C）。图6-D展示了正常组样本间距离的分布箱线图以及正常组与其余各分组样本间距离的箱线图，结果表明分组有显著差异（R=0.224）。PCoA分析结果提示横坐标PCo1贡献率为30.5%，纵坐标PCo2贡献率为17%（图6-E）。NMDS分析发现各组小鼠盲肠内容物群落具有不同的结构

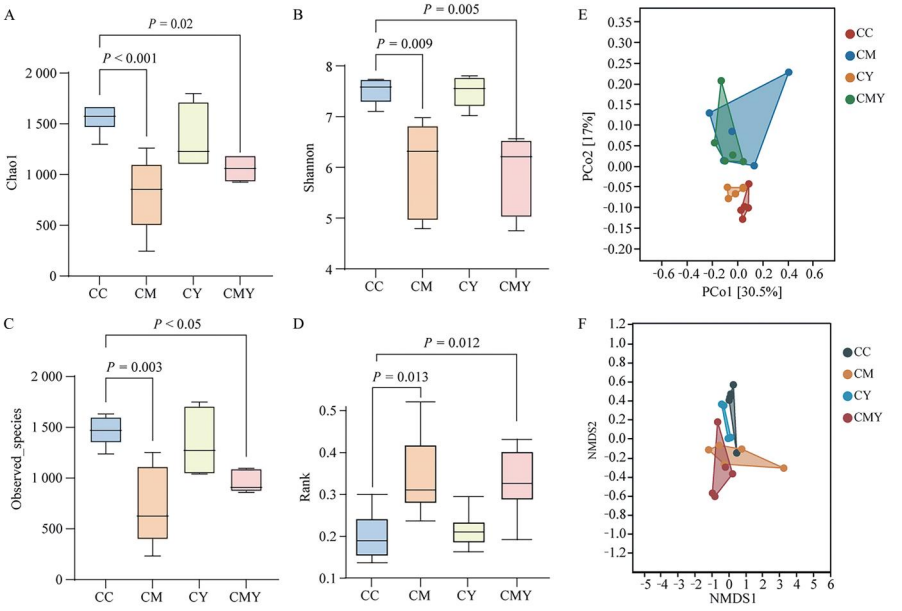


A:结肠SOD活性;B:肾脏SOD活性;C:结肠ROS水平;D:肾脏ROS水平

A: SOD activity in the colon. B: SOD activity in the kidney. C: ROS level in the colon. D: ROS level in the kidney

图5 各组小鼠结肠及肾脏SOD及ROS变化

Fig. 5 Changes in SOD activity and ROS levels in colon and kidney tissues



A：Chao1；B：Shannon；C：Observed species；D：Anosim分析；E：PCoA分析；F：NMDS分析

A: Chao1. B: Shannon. C: Observed species. D: Anosim analysis. E: PCoA analysis. F: NMDS analysis

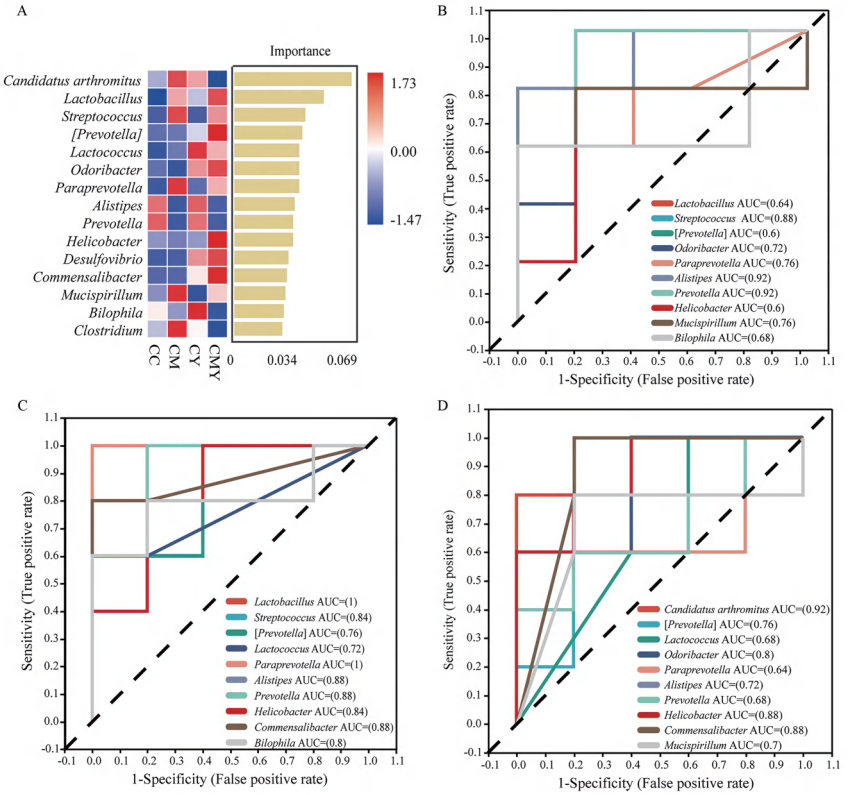
图6　小鼠肠道菌群多样性分析

Fig. 6　Analysis of gut microbiota diversity in mice

分布特征，压力值为0.06，说明分组具有合理性（图6-F）。PCoA分析和NMDS分析显示各组内样本呈现出聚集现象，各组样本有效分离，模型组和TMAO抑制剂+模型组存在重叠现象。

2.5.2　盲肠内容物菌群物种组成　门水平上，4组小鼠盲肠内容物菌群均以Firmicutes、Bacteroidota、Proteobacteria等为主；模型组Firmicute丰度（58.47%）高于正常组（48.75%），而模型组Bacteroidota丰度（30.25%）则低于正常组（41.67%）。属水平上，4组实验小鼠主要由*Lactobacillus*、［*Prevotella*］和*Oscillospira*等组成；模型组中*Bacteroide*（4.54%）、*Parabacteroides*（5.09%）及*Blautia*（5.45%）相对丰度较其他3组升高；而TMAO抑制剂+模型组相对丰度较高的菌属为*Lactobacillus*（29.54%）、［*Prevotella*］（11.94%）。

2.5.3　TMAO对肾阳亏虚证泄泻小鼠特征菌群的影响　采用LEfSe分析评估各组样本之间的差异菌属，LDA阈值设置为2。模型组具有显著差异的属水平物种为*Clostridium*和*Candidatus_arthromitus*等；TMAO抑制剂+模型组具有显著差异的属水平物种为*Treponema*。TMAO抑制剂+模型组具有显著差异的属水平物种为*Commensalibacter*。通过随机森林分析各组样本的标志性物种，筛选出15个重要的特征菌属，按照重要性排序，由高到低分别是：*Candidatus_Arthromitus*、*Lactobacillus*、*Streptococcus*、［*Prevotella*］、*Lactococcus*、*Odoribacter*、*Paraprevotella*、*Alistipes*、*Prevotella*、*Helicobacter*、*Desulfovibrio*、*Commensalibacter*、*Mucispirillum*、*Bilophila*以及*Clostridium*（图7-A），其中*Candidatus_arthromitus*、*Streptococcus*、*Paraprevotella*、*Mucispirillum*以及*Clostridium*为模型组特征菌属。对正常组和模型组的特殊菌属进行ROC分析发现，特征菌属Streptococcus（AUC=0.88）、*Prevotella*（AUC=0.92）、*Alistipes*（AUC=0.92）呈现较大的AUC值（图7-B）；正常组与TMAO抑制剂+模型组比较，特征菌属*Lactobacillus*（AUC=1）、*Helicobacter*（AUC=0.84）、*Commensalibacter*（AUC=0.88）和*Bilophila*（AUC=0.8）均呈现较大的AUC值（图7-C）；对模型组和TMAO抑制剂+模型组的特殊菌属进行ROC分析发现，*Candidatus arthromitus*（AUC=0.92）、*Helicobacter*（AUC=0.88、*Commensalibacter*（AUC=0.88）以及*Odoribacter*（AUC=0.8）呈现较大的AUC值（图7-D）。



A：属水平随机森林图；B：ROC曲线（CC vs CM）；C：ROC曲线（CC vs CMY）；D：ROC曲线（CM vs CMY）

A: Random forest plot at the genus level. B: ROC curve (CC vs CM). C: ROC curve (CC vs CMY). D: ROC curve (CM vs CMY)

图7 随机森林及ROC分析

Fig. 7 Random forest and receiver operating characteristic analyses

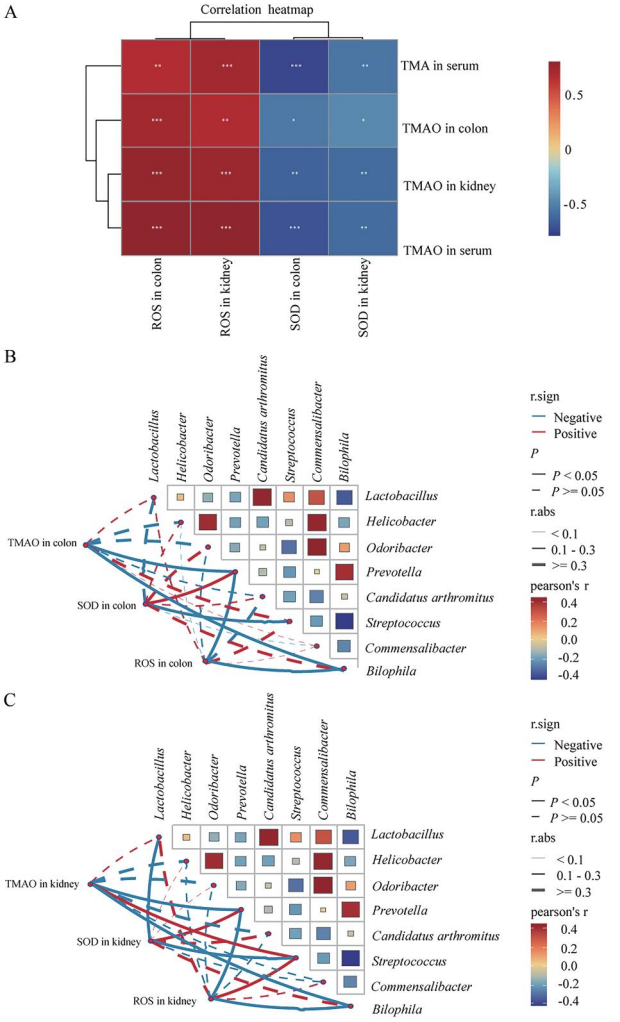
2.6 相关性分析

为探讨TMAO通过肠-肾轴影响氧化应激在肾阳亏虚证泄泻中的作用，采用Spearman对TMAO、TMA、SOD、ROS以及特征菌属之间的关系进行评估，相关性结果通过热图进行可视化展示（图8-A）。血清TMA与结肠、肾脏ROS呈显著正相关，但与结肠、肾脏SOD呈显著负相关。TMAO与结肠、肾脏ROS呈显著正相关，而与结肠、肾脏SOD呈显著负相关。此外，本研究通过随机森林分析结合ROC曲线筛选出各组关键特征菌属，并进一步对这些特征菌属与TMAO、SOD及ROS之间的相关性进行了分析（图8-B,C）。结果显示，正常组特征菌属*Prevotella*与结肠及肾脏SOD呈显著正相关（$P<0.05$），与结肠及肾脏组织TMAO、ROS呈显著负相关（$P<0.05$）。模型组特征菌属*Streptococcus*与结肠及肾脏SOD活性呈显著负相关（$P<0.05$），但与肾脏TMAO及ROS呈显著正相关（$P<0.05$）。TMAO抑制剂+模型组特征菌属*Bilophila*与结肠及肾脏组织TMAO、ROS均呈显著负相关（$P<0.05$）。

3 讨论

3.1 TMAO介导的肠肾交互损伤是肾阳亏虚证泄泻的重要病理基础

TMAO是肠道菌群产生的常见代谢产物，其前体TMA的生成主要依赖肠道厌氧菌。研究发现，TMAO水平在疾病状态下升高，并与肠道菌群结构及代谢功能异常密切相关[27]。课题组前期研究显示，肾阳亏虚证泄泻小鼠血清、结肠和肾脏组织中TMAO水平显著升高；给予外源性TMAO干预模型小鼠后，高水平的TMAO可激活NLRP3炎症小体，促进IL-1β、IL-18及TNF-α等炎症因子释放，导致结肠紧密连接蛋白表达下降，肾功能受损，并引发结肠及肾脏组织炎症损伤，提示TMAO在肠-肾交互损



A：TMAO与氧化应激指标的相关性热图；B：结肠TMAO与氧化应激指标及特征菌属的相关性热图；C：肾脏TMAO与氧化应激指标及特征菌属的相关性热图；红色表示正相关性，蓝色表示负相关性，颜色的梯度表示相关性的强度；*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001；实线表示相关性显著（P<0.05），虚线表示相关性不显著（P>0.05）；线条的粗细表示相关性的强度

A: Heatmap of correlations between TMAO and oxidative stress indicators. B: Heatmap of correlations between colonic TMAO and oxidative stress indicators as well as characteristic bacterial genera. C: Heatmap of correlations between renal TMAO and oxidative stress indicators as well as characteristic bacterial genera. Red indicates positive correlation, blue indicates negative correlation, and the color gradient represents the strength of the correlation. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. Solid lines indicate significant correlation (P<0.05), dashed lines indicate non-significant correlation (P>0.05). The thickness of the lines represents the strength of the correlation

图8　TMAO与氧化应激指标、特征菌属的相关性分析

Fig. 8　Correlation analysis between TMAO, oxidative stress-related indicators, and characteristic bacterial genera

伤中发挥关键作用[9]。本研究进一步采用TMAO抑制剂干预后，血清及组织TMAO水平显著下降，同时有效改善了模型小鼠腹泻症状，并减轻结肠及肾脏组织的炎症损伤。模型组小鼠盲肠内容物菌群的物种丰富度和群落多样性显著下降，且TMAO抑制剂+模型组的盲肠内容物菌群结构与模型组存在一定差异。模型组中存在多种有害菌富集，其中*Clostridium*为含CutC序列较多的菌属之一，提示其可能通过增强TMA生成能力促进TMAO升高[28]；模型组特征菌属*Paraprevotella*等可以通过调控信号通路促进肠道淋巴细胞浸润[29]；研究发现，在肠道炎症模型中，*Mucispirillum*丰度显著增加，并与肠道炎症相关标志物呈正相关[30]。相比之下，TMAO抑制剂组及TMAO抑制剂+模型组出现了一些有益菌属。例如，*Treponema*在健康状态下相对丰度较高，但在肠道炎症发生时相对丰度会下降[31-32]；*Odoribacter*属部分菌株具有免疫调节和抗炎活性[32-33]。本研究还发现，TMAO抑制剂+模型组特征菌属*Bilophila*与TMAO及ROS水平呈负相关。已有研究表明，*Bilophila*属细菌可通过去甲基化途径代谢TMA，将其转化为二甲胺，进而减少TMAO的生成[34]。综上，肠道菌群失衡引起TMAO异常升高，进而激活炎症小体并促进炎症因子释放，是肠-肾交互损伤及肾阳亏虚证泄泻发生发展的重要病理基础；而TMAO抑制剂通过降低TMAO水平、改善菌群结构及炎症状态，可部分逆转上述病理过程。

3.2　TMAO通过氧化应激通路介导肾阳亏虚证泄泻的肠-肾交互损伤

当机体产生活性氧过多，抗氧化能力下降时就会发生氧化应激。SIRT3是线粒体NAD^+依赖型去乙酰化酶，可通过激活SOD2等关键抗氧化酶维持线粒体氧化还原稳态，减少ROS的产生和积累，改善氧化应激和炎症微环境[35]。肠道菌群代谢产物可以通过增强SIRT3介导的SOD2去乙酰化活性来降低ROS水平，缓解氧化应激和组织损伤[36]。研究表明，TMAO可抑制SIRT3表达，导致SOD2去乙酰化水平下降，ROS清除能力减弱，体内ROS积累，进而激活NLRP3炎症小体诱发炎症反应，加重组织损伤[37]。当SIRT3和SOD2活性被抑制时，ROS水平将升高，从而加速肾损伤；相反，上调SIRT3和

SOD2蛋白的表达将逆转肾细胞损伤过程[38]。本研究发现，肾阳亏虚证泄泻模型小鼠结肠及肾脏组织中SIRT3、SOD2蛋白表达及SOD活性均显著下降，结肠及肾脏组织中ROS水平升高，造成氧化应激损伤，破坏肠、肾组织结构。而TMAO抑制剂干预后的模型小鼠组织SIRT3和SOD2表达明显高于模型组，ROS水平有下降趋势，提示抑制TMAO可降低氧化应激反应，从而减轻肠-肾交互损伤。肠道氧化应激可破坏肠黏膜屏障，促进肠源性尿毒素及炎症介质进入循环，诱导肾脏损伤；而在慢性肾损伤状态下，尿毒症毒素蓄积亦可进一步破坏肠屏障结构，形成肠-肾交互损伤。相关性分析提示，TMAO与组织ROS水平呈显著正相关，而与SOD活性呈显著负相关。此外，已有研究发现*Streptococcus*在多种肠道疾病中显著升高[39]；并与肾脏疾病的发生发展密切相关[40]。本研究结果亦显示，*Streptococcus*与TMAO和ROS呈正相关，而与SOD呈负相关，提示其可能作为参与肠-肾损伤的重要潜在致病菌。肠道菌群失衡可导致血清及组织中TMAO水平升高，TMAO通过抑制SIRT3表达并降低SOD2抗氧化活性，导致ROS过量积累，从而诱发结肠及肾脏组织氧化应激和结构损伤。本研究不仅揭示了肠道菌群代谢产物TMAO在肾阳亏虚证泄泻中的潜在病理机制，也为基于肠-肾轴的肠道及肾脏疾病研究提供了实验依据。然而，本研究仍存在一定局限性。尽管SIRT3-SOD2-ROS通路是经典的氧化应激调控通路，但目前尚缺乏TMAO调控该通路的细胞实验研究。未来仍需结合体外实验，进一步阐明TMAO介导SIRT3-SOD2-ROS通路在肠-肾损伤中的作用机制。

4 结论

肾阳亏虚证泄泻小鼠肠道菌群失调，TMAO水平升高，SIRT3及SOD2表达降低，ROS水平升高；TMAO抑制剂可上调SIRT3和SOD2表达、降低ROS水平，改善肠、肾组织损伤。TMAO通过影响SIRT3-SOD2-ROS通路介导肠-肾损伤，参与腹泻的发生发展。

参考文献

[1] Guggeis MA, Harris DM, Welz L, et al. Microbiota-derived metabolites in inflammatory bowel disease [J]. Semin Immunopathol, 2025, 47: 19.

[2] Li XY, Peng XX, Qiao B, et al. Gut-kidney impairment process of adenine combined with folium sennae-Induced diarrhea: association with interactions between *Lactobacillus intestinalis*, *Bacteroides acidifaciens* and acetic acid, inflammation, and kidney function [J]. Cells, 2022, 11(20): 3261.

[3] Zhu T, Hu BY, Zhang YQ, et al. The role of microbial metabolites in diabetic kidney disease [J]. Heliyon, 2023, 9(7): e17844.

[4] Tsuji K, Uchida N, Nakanoh H, et al. The gut-kidney axis in chronic kidney diseases [J]. Diagnostics, 2025, 15(1): 21.

[5] Wang CC, Duan XF, Li XY, et al. Trimethylamine *N*-oxide generation process was influenced by the proportion and source of macronutrients in the diet [J]. Food Sci Hum Wellness, 2024, 13 (2): 649-658.

[6] Paulina G, Joanna K. Trimethylamine N-oxide (TMAO) in human health [J]. EXCLI J, 2021, 20: 301-319.

[7] Pahl MV, Vaziri ND. The chronic kidney disease—colonic axis [J]. Semin Dial, 2015, 28(5): 459-463.

[8] 彭印, 徐雪君, 李建萍, 等. 靶向肠道菌群调控肠源尿毒素代谢通路干预慢性肾病进展的治疗策略分析 [J]. 药学学报, 2021, 56(1): 37-49.
Peng Y, Xu XJ, Li JP, et al. Strategy to delay the progression of chronic kidney disease by targeting gut microbiota and uremic toxins metabolism pathway [J]. Acta Pharm Sin, 2021, 56(1): 37-49.

[9] Fang LY, Shen JX, Xiao NQ, et al. TMAO activates the NLRP3 inflammasome, disrupts gut-kidney interaction, and promotes intestinal inflammation [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(15): 7441.

[10] Liu LW, Xie Y, Li GQ, et al. Gut microbiota-derived nicotinamide mononucleotide alleviates acute pancreatitis by activating pancreatic SIRT3 signalling [J]. British J Pharmacology, 2023, 180(5): 647-666.

[11] Nakano H, Setoguchi S, Kawano K, et al. Effects of amazake produced with different *Aspergillus* on gut barrier and microbiota [J]. Foods, 2023, 12(13): 2568.

[12] Peng YQ, Li YS, Pi YZ, et al. Effects of almond (*Armeniaca* Sibirica L. Lam) polysaccharides on gut microbiota and anti-inflammatory effects on LPS-induced RAW264.7 cells [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 263: 130098.

[13] Saaoud F, Liu L, Xu KM, et al. Aorta- and liver-generated TMAO enhances trained immunity for increased inflammation via ER stress/mitochondrial ROS/glycolysis pathways [J]. JCI Insight, 2023, 8: e158183.

[14] Dong F, Jiang S, Tang C, et al. Trimethylamine N-oxide promotes hyperoxaluria-induced calcium oxalate deposition and kidney injury by activating autophagy [J]. Free Radic Biol Med, 2022, 179: 288-300.

[15] Chen ML, Zhu XH, Ran L, et al. Trimethylamine-N-oxide induces

vascular inflammation by activating the NLRP3 inflammasome through the SIRT3-SOD2-mtROS signaling pathway [J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(9): e006347.

[16] Zhang Y, Bai XZ, Shen K, et al. Exosomes derived from adipose mesenchymal stem cells promote diabetic chronic wound healing through SIRT3/SOD2 [J]. Cells, 2022, 11(16): 2568.

[17] Xie SY, Zou W, Liu SR, et al. Site 1 protease aggravates acute kidney injury by promoting tubular epithelial cell ferroptosis through SIRT3-SOD2-mtROS signaling [J]. FEBS J, 2024, 291(7): 1575-1592.

[18] Guan S, Wang ZY, Zhang RR, et al. 3-MCPD induced mitochondrial damage of renal cells via the rhythmic protein BMAL1 targeting SIRT3/SOD2 [J]. J Agric Food Chem, 2023, 71(39): 14351-14364.

[19] Wu Y, Peng XX, Li XY, et al. Sex hormones influence the intestinal microbiota composition in mice [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 964847.

[20] Fang LY, Shen JX, Wu Y, et al. Involvement of intestinal mucosal microbiota in adenine-induced liver function injury [J]. 3 Biotech, 2025, 15: 6.

[21] Guo MM, Fang LY, Chen ML, et al. Dysfunction of cecal microbiota and CutC activity in mice mediating diarrhea with kidney-Yang deficiency syndrome [J]. Front Microbiol, 2024, 15: 1354823.

[22] Heng X, Liu WG, Chu WH. Identification of choline-degrading bacteria from healthy human feces and used for screening of trimethylamine (TMA)-lyase inhibitors [J]. Microb Pathog, 2021, 152: 104658.

[23] Ferrell M, Bazeley P, Wang ZN, et al. Fecal microbiome composition does not predict diet-induced TMAO production in healthy adults [J]. J Am Heart Assoc, 2021, 10(21): e021934.

[24] Koeth RA, Levison BS, Culley MK, et al. γ-butyrobetaine is a proatherogenic intermediate in gut microbial metabolism of L-carnitine to TMAO [J]. Cell Metab, 2014, 20(5): 799-812.

[25] He L, Long CX, Liu YJ, et al. Effects of *Debaryomyces hansenii* treatment on intestinal microorganisms in mice with antibiotics-induced diarrhea [J]. 3 Biotech, 2017, 7(5): 347.

[26] Long CX, Liu YW, He L, et al. Bacterial lactase genes diversity in intestinal mucosa of dysbacterial diarrhea mice treated with Qiweibaizhu powder [J]. 3 Biotech, 2018, 8(10): 423.

[27] Nian FL, Chen YY, Xia QY, et al. Gut microbiota metabolite trimethylamine N-oxide promoted NAFLD progression by exacerbating intestinal barrier disruption and intrahepatic cellular imbalance [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 142: 113173.

[28] Cai YY, Huang FQ, Lao XZ, et al. Integrated metagenomics identifies a crucial role for trimethylamine-producing Lachnoclostridium in promoting atherosclerosis [J]. npj Biofilms Microbiomes, 2022, 8: 11.

[29] Lu Y, Cui AX, Zhang XB. Commensal microbiota-derived metabolite agmatine triggers inflammation to promote colorectal tumorigenesis [J]. Gut Microbes, 2024, 16: 2348441.

[30] Caruso R, Mathes T, Martens EC, et al. A specific gene-microbe interaction drives the development of Crohn's disease-like colitis in mice [J]. Sci Immunol, 2019, 4(34): eaaw4341.

[31] Wu ZL, Li XY, Wang Y, et al. Microbiome analysis reveals gut bacterial alterations in adult Tibetan pigs with diarrhea [J]. Front Microbiol, 2025, 16: 1524727.

[32] Liu PY, Xia D, McGonigle K, et al. Immune-mediated hematological disease in dogs is associated with alterations of the fecal microbiota: a pilot study [J]. Anim Microbiome, 2023, 5: 46.

[33] Hiippala K, Barreto G, Burrello C, et al. Novel *Odoribacter splanchnicus* strain and its outer membrane vesicles exert immunoregulatory effects *in vitro* [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 575455.

[34] Kivenson V, Giovannoni SJ. An expanded genetic code enables trimethylamine metabolism in human gut bacteria [J]. mSystems, 2020, 5(5): e00413-e00420.

[35] Juszczak F, Arnould T, Declèves AE. The role of mitochondrial sirtuins (SIRT3, SIRT4 and SIRT5) in renal cell metabolism: implication for kidney diseases [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(13): 6936.

[36] Dai M, Wang YM, Dong HK, et al. Urolithin A alleviates vascular remodeling through mitochondrial SIRT3-mediated SOD2 deacetylation and antioxidation in hypertensive rats [J]. Redox Rep, 2026, 31: 2622255.

[37] Shanmugham M, Bellanger S, Leo CH. Gut-derived metabolite, trimethylamine-N-oxide (TMAO) in cardio-metabolic diseases: detection, mechanism, and potential therapeutics [J]. Pharmaceuticals, 2023, 16(4): 504.

[38] Azzouz RS, Yan LJ. The role of Sirt3 in kidney health and disease [J]. Pharmaceuticals, 2025, 18(11): 1668.

[39] Acar C, Celik SK, Ozdemirel HO, et al. Composition of the colon microbiota in the individuals with inflammatory bowel disease and colon cancer [J]. Folia Microbiol, 2024, 69(2): 333-345.

[40] Zhang R, Tang YY, Lu XX, et al. Targeted modulation of intestinal barrier and mucosal immune-related microbiota attenuates IgA nephropathy progression [J]. Gut Microbes, 2025, 17: 2458184.

（责任编辑　张婷婷）

生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(11):340-350

耐冷耐碱反硝化细菌 *Stutzerimonas stutzeri* 2B的脱氮特性及应用

刘晋雅[1,2] 张莹[3] 张媛[3] 车佳轩[1] 郭艾英[1,2*] 秦保平[4] 蔡爱军[2] 郑会会[3*]

（1.河北科技师范学院农学与生物科技学院,秦皇岛 066004; 2.河北科技师范学院 河北省海洋动力过程与资源环境重点实验室,秦皇岛 066004; 3.河北科技师范学院海洋资源与环境学院,秦皇岛 066004; 4.河北科技师范学院 河北省作物逆境生物学重点实验室,秦皇岛 066004）

摘 要:【目的】针对北方冬季海水水产养殖中NO_3^--N去除效率低的问题，筛选高效耐冷耐碱反硝化菌株，为养殖尾水处理提供菌种资源。【方法】从渤海海域水产养殖尾水中筛选到菌株2B。通过形态学、生理生化特征及16S rRNA基因序列分析，鉴定菌株为施氏假单胞菌 *Stutzerimonas stutzeri*。通过单因素试验考察菌株的反硝化性能，以NH_4^+-N、NO_3^--N和NO_2^--N为单一或混合氮源，研究其脱氮性能和氮代谢途径。【结果】菌株以淀粉为最优碳源，在C/N=5、盐度3%、pH 8的最佳条件下，低温10 ℃培养96 h，NO_3^--N去除率达99.80%；菌株能耐受pH 11的强碱环境，96 h内NO_3^--N去除率达87.72%，属于中度嗜碱菌。此外，菌株也能以NH_4^+-N或NO_2^--N为单一氮源生长，在混合氮源中进行异养硝化或好氧反硝化。全基因组分析表明，菌株具有完整的反硝化途径：NO_3^--N→NO_2^--N→NO→N_2O→N_2，同时具有耐冷基因 *katG* 和合成海藻糖、谷氨酸等小分子物质的耐盐碱相关基因。在大菱鲆海水养殖尾水中加入菌株2B，NO_3^--N被完全降解且无其他含氮化合物产生。【结论】菌株2B在低温、低C/N、中高盐度和碱性条件下展现了优异的反硝化性能，为北方冬季海水养殖尾水的生物脱氮处理提供潜在的菌种资源与技术依据。

关键词： 耐冷耐碱菌；低C/N；好氧反硝化；脱氮途径；海水养殖尾水

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0059

Denitrification Characteristics and Application of Psychrotolerant and Alkali-tolerant Denitrifying Bacterium *Stutzerimonas stutzeri* Strain 2B

LIU Jin-ya[1,2] ZHANG Ying[3] ZHANG Yuan[3] CHE Jia-xuan[1] GUO Ai-ying[1,2*] QIN Bao-ping[4] CAI Ai-jun[2] ZHENG Hui-hui[3*]

（1. *College of Agronomy and Biotechnology, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao* 066004; 2. *Hebei Key Laboratory of Ocean Dynamics, Resource and Environment, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao* 066004; 3. *College of Marine Resources & Environment, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao* 066004; 4. *Hebei Key Laboratory of Crop Stress Biology, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao* 066004）

Abstract:【Objective】To overcome the low NO_3^--N removal efficiency in northern seawater aquaculture during winter, psychrotolerant and alkali-tolerant denitrifying strains were screened for aquaculture wastewater treatment applications.【Method】Strain 2B was isolated from aquaculture wastewater in the Bohai Sea. Based on morphological, physiological, biochemical characteristics, and 16S rRNA gene sequence analysis, the strain was identified as *Stutzerimonas stutzeri*. Single-factor experiments were conducted to evaluate the denitrification performance of strain 2B, and its nitrogen removal capabilities and metabolism pathways were investigated with NH_4^+-N, NO_3^--N, and NO_2^--N as single or mixed nitrogen sources.【Result】Starch was the optimal carbon source for the strain. Under optimal conditions of C/N=5, salinity 3%, and pH 8, a 96-hour culture achieved a NO_3^--N removal rate of 99.80% at a low temperature of 10 ℃. Notably, the strain achieved 87.72% NO_3^--N removal in 96 h at pH 11, indicating that it is a moderately alkaliphilic bacterium. Moreover, the strain could grow with NH_4^+-N or NO_2^--N as the sole nitrogen source and perform heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in mixed nitrogen sources. Whole-genome analysis demonstrated

收稿日期：2026-01-14

基金项目：河北省重点研发计划项目（22326502D），省属高校基本科研业务费（2023JK08），河北科技师范学院科学研究基金（2023YB018）

*通信作者：郭艾英 guoaiying@hevttc.edu.cn，郑会会 huihui951012@sina.com

that the strain possessed a complete denitrification pathway: NO_3^--N → NO_2^--N → NO → N_2O → N_2, and also harbored the cold-tolerance gene *katG*, along with genes related to salinity-alkalinity tolerance involved in the synthesis of small molecules such as trehalose and glutamic acid. When applied to the seawater aquaculture wastewater of *Larimichthys crocea*, NO_3^--N was completely degraded without the accumulation of other nitrogenous compounds.【Conclusion】Strain 2B exhibits excellent nitrogen removal performance under low temperature, low C/N ratio, moderate salinity, and alkaline conditions, providing a potential microbial resource and technical foundation for the biological nitrogen removal treatment of mariculture wastewater in northern regions during winter.

Keywords: psychrotolerant and alkali-resistant bacterium; low C/N ratio; aerobic denitrification; nitrogen metabolism pathway; seawater aquaculture wastewater

随着水产养殖业的快速发展，养殖尾水排放导致的环境污染问题日益突出。全球每年排放的尾水中，NH_4^+-N、NO_2^--N和NO_3^--N等无机氮化合物含量高达100万–140万t[1]，造成了水体富营养化，严重制约养殖业的进一步发展。因此，高效去除水体中氮化合物对水产养殖业可持续发展至关重要。

传统的脱氮技术主要为物理化学法和生物法[2]。物理化学法通过对硝酸盐进行浓缩或转移，具有稳定快速的优点，但是伴随有毒有害副产物产生[3]。生物脱氮技术包括硝化和反硝化2个过程，由硝化细菌在好氧条件下将NH_4^+-N转化为NO_3^--N，然后在厌氧环境下反硝化细菌将NO_3^--N进一步还原生成N_2[4]，完成氮的彻底去除，具有成本低、无二次污染等优点。Robertson和Kuenen于1984年首次分离出可在有氧条件下进行反硝化的副球菌（*Paracoccus* sp.）[5]，为好氧反硝化技术发展奠定了理论基础。迄今，已报道的好氧反硝化细菌已涵盖50个属130余种，包括假单胞菌属（*Pseudomonas*）[6–7]、产碱杆菌属（*Alcaligenes*）[8–9]、无色杆菌属（*Achromobacter*）[10]、副球菌属（*Paracoccus*）[11]等。

近年来，研究人员围绕好氧反硝化细菌在不同环境条件下的反硝化特性展开了研究。例如许敬轩团队报道的菌株WM27（*Klebsiella oxytoca*）在3%的盐度下，20 ℃培养，对NO_3^--N的去除率接近75%[12]；董怡华等[13]报道的*Aeromonas* sp. Z6，在低温（12 ℃）条件对NO_3^--N的去除率达89.72%，但该菌株仅能耐受1%盐度；韩冰等[14]分离的嗜碱菌株*Pseudomonas Stutzeri* HK13，可在pH为10条件下生长，但该菌株适宜生长温度为30–40 ℃。此外，董文迅等[15]筛选出的耐盐耐冷*Acinetobacter* sp，在15 ℃、4%盐度条件下，NO_3^--N去除率为68.3%；别绮雯等[16]筛选的耐盐耐碱菌株*Stutzerimonas degradans* BP，能耐受4%盐度、pH为8的碱性条件，但当温度低于20 ℃时，该菌无法进行反硝化。这些菌株多仅在单一胁迫因子（如低温、高盐或高碱）下表现出良好脱氮性能，难以适应多重因素胁迫的复杂环境。在我国北方地区（如河北省秦皇岛市）的大多数海水养殖系统中，冬季水体兼具低温（10–15.8 ℃）、盐度3%及局部偏碱性等特点[17]，在此条件下多数反硝化细菌生长受限，严重影响冬季养殖尾水的生物脱氮处理效果。因此，筛选兼具耐冷、耐盐、耐碱特性且脱氮效率高的好氧反硝化菌株，对于提升寒冷季节海水养殖尾水的生物脱氮处理效能具有实际意义。

基于此，本研究从秦皇岛渤海海域水产养殖尾水中筛选能够适应低温、高盐、碱性环境的反硝化菌株。通过分子鉴定确定其种属关系，分析菌株的反硝化条件和脱氮途径，并验证该菌株在实际养殖尾水中的脱氮性能。本研究结果将丰富脱氮功能菌株资源，为海水养殖尾水氮素处理提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　样品来源　河北省秦皇岛市昌黎县黄金海岸附近水产养殖工厂的养殖尾水。

1.1.2　培养基　硝化培养基（nitrification medium, NM）（g/L）：NH_4Cl 0.28，淀粉1.12，维多氏盐溶液1.00。基础反硝化培养基（denitrifying medium, DM）（g/L）：KNO_3 0.72，丁二酸钠6.00，维多氏盐溶液1.00。改良反硝化培养基（g/L）：DM-1（KNO_3 0.72）或DM-2（$NaNO_2$ 0.10）或DM-3（KNO_3 0.58、$NaNO_2$ 0.10），淀粉1.12，维多氏盐溶液1.00。异养硝化好氧反硝化培养基（simultaneous denitrification medium, SNDM）（g/L）：NH_4Cl 0.15，KNO_3 0.36，$NaNO_2$ 0.05，淀粉

1.12，维多氏盐溶液1.00。维多氏盐溶液（g/L）：$K_2HPO_4\cdot 3H_2O$ 1.0，KH_2PO_4 0.3，$MgSO_4\cdot 7H_2O$ 0.05，$FeSO_4\cdot 7H_2O$ 0.01，$MnSO_4\cdot 4H_2O$ 0.01，NaCl 30，pH 8。1% BTB：1 g溴百里酚蓝溶于100 mL无水乙醇；Luria-Bertani（LB）培养基（g/L）：酵母浸粉5，胰蛋白胨10，NaCl 10，pH 8，相应固体培养基添加琼脂20 g。

1.2 方法

1.2.1 菌株的筛选及鉴定 以黄金海岸附近水产养殖工厂的养殖尾水为样品，经富集培养后将培养液梯度稀释，涂布在BTB固体培养基上进行初筛，挑取变蓝的菌株进行编号，纯化后保存备用。各菌株转接至DM液体培养基中复筛，10 ℃、120 r/min振荡培养，96 h后检测上清液中NO_3^--N含量，选择氮去除率最高的菌株进行后续研究。

将菌株转接至LB固体培养基，进行形态观察和生理生化特性分析，并采用扫描电镜（scanning electron microscope, SEM）观察菌株个体形态。同时，扩增菌株16S rRNA基因序列，产物送生工生物公司（上海）股份有限公司进行测序。测序结果经NCBI网站（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast）进行在线BLAST比对分析，利用MEGA软件中的Neighbor-joining方法构建系统发育树，确定菌株的种属关系。

1.2.2 菌株2B培养条件优化 通过单因素试验明确碳源、碳氮比（C/N）、接种量（v/v）、转速、pH、温度和盐度对菌株脱氮性能的影响。影响因子设定如下：碳源分别为葡萄糖、蔗糖、淀粉、麦芽糖、甲醇、乙酸钠、海藻酸钠、丁二酸钠、柠檬酸钠；温度为5、10、15、20、25、30、35、40 ℃；转速为80、100、120、140 r/min；接种量为1%、2%、3%、4%、5%；C/N为2、5、10、15、20、25、30；初始pH为5、6、7、8、9、10、11；盐度为1%、2%、3%、3.5%、4%、5%。依次确定最佳培养条件。培养条件：将种子液（OD_{600}=1.0）按2.5%（v/v）接种量转接至100 mL三角瓶中，装液量为40 mL，除变量调整外，其他因素保持不变，每隔24 h取样，测定NO_3^--N去除率（公式1），所有实验均设置3次重复。

氮去除率计算公式[18]：

$$R(\%) = (N_0 - N_t)/N_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中：N_0：初始氮浓度；N_t：时间t时的氮浓度

选取C/N（*A*）、pH（*B*）、盐度（*C*）为自变量，NO_3^--N去除率（*Y*）为响应值进行响应面分析。利用Design-Expert 13软件进行Box-Behnken设计，共构建17组实验，探究各因素对NO_3^--N去除率的影响。

1.2.3 氮代谢性能分析 分别以单一氮源培养基NM、DM-1和DM-2，混合氮源培养基DM-3和SNDM，以优化后的条件培养，探究菌株的硝化和反硝化特性。每24 h取样，测定OD_{600}以及NH_4^+-N、NO_3^--N、NO_2^--N、TN的含量。以反应终止（t时）的培养液为样品，依据质量守恒原理，计算氮平衡（公式2、公式3），分析菌株的氮代谢途径。

氮平衡计算公式[19]：

$$Re_{in}(\%) = (TN_t - TN_s)/TN_i \times 100 \quad (2)$$

$$Re_g(\%) = (TN_i - TN_t)/TN_i \times 100 \quad (3)$$

其中，TN_i：初始（0时）培养液的总氮浓度（mg/L）；TN_t：反应终止（t时）培养液的总氮浓度（mg/L）；TN_s：t时培养液离心后上清液的总氮浓度（mg/L）；胞内氮转化率Re_{in}：t时培养液的总氮浓度TN_t与离心后上清液总氮浓度TN_s的差值占初始培养液总氮浓度TN_i的比值（%）；气态氮转化率Re_g：初始培养液总氮浓度TN_i与t时培养液的总氮浓度TN_t的差值占培养液初始总氮浓度TN_i的比值（%）。

1.2.4 全基因组测序 将培养至对数生长期的菌株委托生工生物工程（上海）股份有限公司进行全基因组测序。基于测序结果与公共数据库进行对比，分析菌株的脱氮、耐盐、耐低温、耐碱相关基因，解析其氮代谢通路。

1.2.5 菌株对养殖尾水处理效能 以大菱鲆养殖尾水为样品，其初始氮浓度分别为NH_4^+-N 0.76 mg/L、NO_3^--N 1.73 mg/L、NO_2^--N 0.26 mg/L、TN 2.74 mg/L、pH 7.5。为探究菌株对不同浓度NO_3^--N去除效果，通过向尾水中添加KNO_3调节NO_3^--N浓度约30 mg/L和50 mg/L，并添加淀粉，使C/N为5。以未接种的尾水为对照，按优化后的条件培养，研究菌株的脱氮效能。

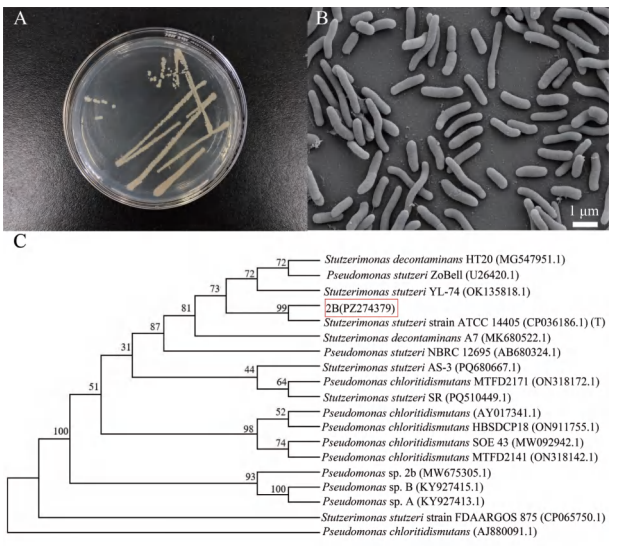
1.2.6 检测方法 NH_4^+-N、NO_3^--N、NO_2^--N、TN浓度均采用国际标准方法测定；吸光度法测定OD_{600}。

1.2.7 数据分析 采用Design-Expert 13软件进行数据统计分析，MEGA 11.0和Origin 2024绘制图形，所有实验重复3次。

2　结果

2.1　菌株的筛选分离与鉴定

样品经富集、BTB培养基初筛和摇瓶复筛，得出菌株2B的脱氮性能最佳。经LB培养基培养，菌落呈乳白色、圆形、边缘规则、表面光滑、突起、黏稠、易挑起（图1-A）。该菌株为革兰氏阴性菌，具有淀粉酶活性，在硝酸盐还原试验、吲哚试验、氧化酶活性和触酶试验中呈阳性，明胶试验、VP试验和甲基红试验呈阴性，SEM观察（图1-B）可知菌体呈杆状，大小为（0.40–0.54）μm×（1.58–1.95）μm。菌株的16S rRNA基因序列在GenBank的序列登录号为PZ274379。利用MEGA构建系统发育树（图1-C），可知菌株2B与模式菌株 *Stutzerimonas stutzeri*（ATCC 14405）具有99%的同源性。全基因组测序结果（登录号：JBXFXG000000000）表明菌株2B的大小为4 502 623 bp，GC含量为61.57%。该菌株与模式菌株 *S. stutzeri* 基因组的平均核苷酸一致性（average nucleotide identity, ANI）值为97.88%，DNA-DNA杂交（digital DNA-DNA hybridization, dDDH）值为86.10%。在种水平分类中，ANI和dDDH临界值一般为93%和70%。这些结果表明，菌株2B为 *S. stutzeri*，命名为 *S. stutzeri* 2B。



A：菌落形态；B：扫描电镜图片；C：基于16S rRNA基因序列构建菌株2B的系统发育树

A: Colony morphology; B: Scanning electron microscope images; C: Phylogenetic tree of strain 2B based on 16S rRNA gene sequences

图1　菌株2B形态观察与鉴定

Fig. 1　Morphological observation and identification of strain 2B

2.2　环境因子对菌株2B脱氮性能的影响

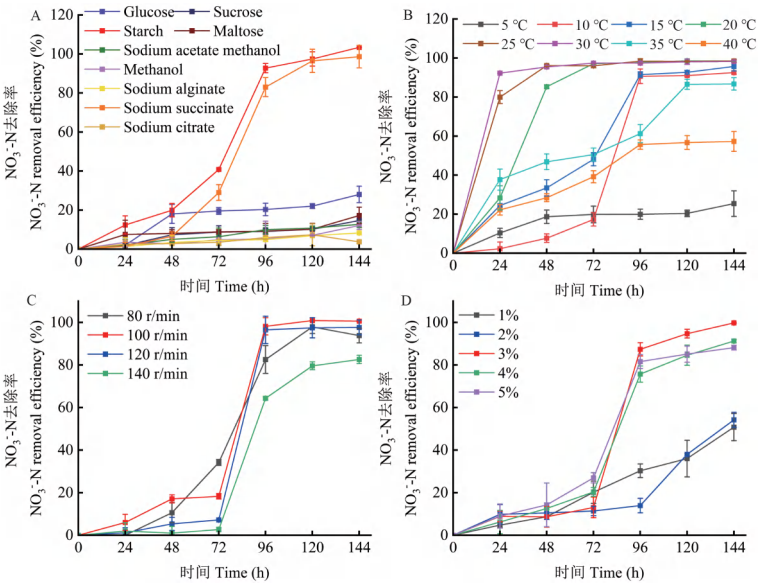
2.2.1　基于单因素实验菌株脱氮性能分析　由图2-A可知，碳源对菌株2B的生长影响较大。当以葡萄糖、甲醇、乙酸钠、柠檬酸钠、D-麦芽糖、蔗糖、海藻酸钠为碳源时，培养144 h，NO_3^--N去除率均低于40%，表明菌种不能很好地利用这些物质。而以丁二酸钠和淀粉为碳源时，培养至96 h，NO_3^--N去除率分别为83.30%和93.06%，至144 h，NO_3^--N几乎被完全降解，说明这2种物质更利于菌种的生长和NO_3^--N的去除。考虑到菌株具有淀粉酶活性，且淀粉为农产品，具有成本低、易获取的优点，因此选用淀粉为碳源进行后续研究。

菌株在不同温度下的脱氮性能如图2-B所示。培养温度为5 ℃时，至144 h，NO_3^--N去除率仅为19.91%；10–30 ℃时，NO_3^--N去除率在96 h均超过90%，且温度越高，达到峰值的时间越短；继续升高温度，其脱氮效率降低，至40 ℃，NO_3^--N去除率仅为57.27%。综合其应用场景，选择10 ℃进行后续研究。

摇床转速会影响菌株的脱氮效率。由图2-C可知，随转速增加，菌株2B的NO_3^--N去除率呈先升高后降低趋势。其中100 r/min，去除率最高，接近100%。转速升高，菌株NO_3^--N去除率随之下降。因此，最佳转速设定为100 r/min。接种量也会影响菌株对NO_3^--N去除率（图2-D），随接种量的升高，菌株对NO_3^--N去除率呈先升高后降低的趋势。当接种量为1%和2%时，培养至144 h时，菌株对NO_3^--N去除率都低于60%；3%时，去除率最高，为99.76%；继续增加至4%和5%时，其去除率又降低。因此，最佳接种量为3%。

2.2.2　基于Box-Behnken设计的脱氮条件优化　基于Box-Behnken中心组合设计原理，以NO_3^--N（Y）的去除率为响应值，对影响菌株脱氮效果的C/N（A）、pH（B）和盐度（C）3个因素进行优化，结果见附表1。对数据进行二次多项回归拟合，得到回归方程模型为：$Y = -147.679\ 45 + 9.735\ 68A + 48.582\ 14B + 9.999\ 12C + 0.776\ 111AB + 0.887\ 500AC - 0.597\ 917BC - 1.657\ 72A^2 - 2.872\ 51B^2 - 2.921\ 90C^2$。

对模型进行方差分析，结果见附表2。该模型$P<$



A:碳源;B:温度;C:转速;D:接种量

A: Carbon sources; B: Temperatures; C: Rotation speeds; D: Inoculum size

图2 不同条件对菌株2B的反硝化特性影响

Fig. 2 Denitrification characteristics of the strain under different conditions

0.01，表明在研究回归区域内拟合性很好。模型中失拟项为0.066 5>0.05，差异不显著，表明无失拟因素存在。C/N（*A*）、pH（*B*）和盐度（*C*）的*P*值都小于0.01，表明它们对NO_3^--N去除率有极显著影响。交互项*AB*的*P*值小于0.01，*AC*的*P*值小于0.05，表明C/N与pH之间的交互作用极显著，C/N与盐度之间作用显著。

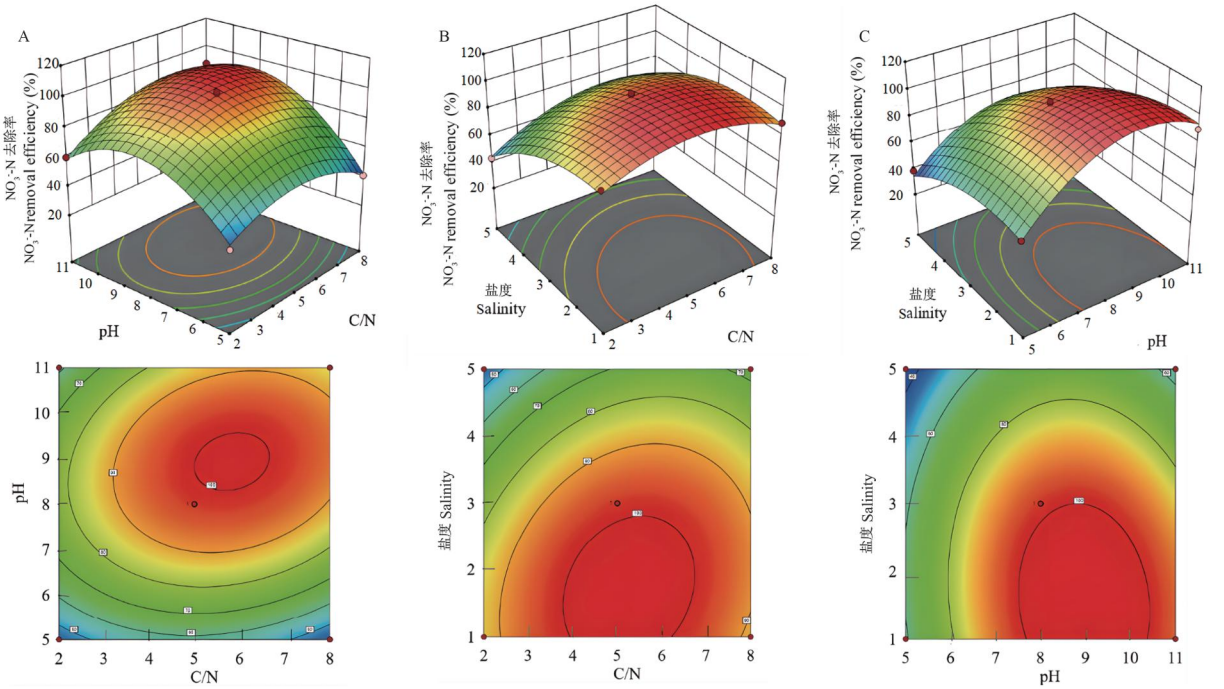
根据回归方程制作的响应面图见图3。图3均为开口向下的凸形曲面，且两因素间倒映的等高线呈椭圆形，表明C/N和pH、C/N和盐度、pH和盐度之间存在显著的交互作用。方差分析显示，pH（*B*）和盐度（*C*）交互作用不显著（*P*>0.05）（附表2）。对构建的回归方程模型进行偏导微分处理，得出菌株实现最大NO_3^--N去除率的培养条件为：C/N 6.83、pH 8.80、盐度1.83%，其理论NO_3^--N去除率可达100%。考虑到菌株将应用于海水养殖尾水处理，因而将条件调整为C/N 5、pH 8.0、盐度3%，并进行了验证，培养96 h，其对NO_3^--N的去除率为99.80%，与预测值误差仅为0.20%。因此，回归方程较准确地预测出菌株2B在低C/N、碱性和3%盐度条件下的脱氮效果。

2.3 菌株脱氮与生长特性分析

2.3.1 菌株的异养硝化性能 由图4-A可知，以NH_4^+-N为唯一氮源，菌株在培养初期生长缓慢，72 h进入对数生长期，96 h时OD_{600}达到最大值，为0.92，之后进入稳定期。菌株培养至144 h时，NH_4^+-N从75.00 mg/L降至13.21 mg/L，去除率为82.38%。整个培养过程中，TN的浓度变化趋势与NH_4^+-N一致；NO_3^--N有少量积累，在96 h浓度为3.01 mg/L，144 h几乎被降解完全；NO_2^--N无明显积累。

2.3.2 菌株的好氧反硝化性能 由图4-B可知，以NO_3^--N为唯一氮源时，菌株48 h进入对数生长期，培养至96 h，OD_{600}达到最高1.07。在此期间，NO_3^--N含量从98.48 mg/L迅速下降至10.36 mg/L，去除率为90.25%。继续培养至144 h，NO_3^--N去除率接近100%。培养过程中，有NO_2^--N和NH_4^+-N的产生，其峰值浓度分别为4.06 mg/L和11.20 mg/L，至144 h时，NO_2^--N几乎检测不到，但NH_4^+-N仍有4.90 mg/L，TN含量为5.13 mg/L。

以NO_2^--N为唯一氮源时，培养至144 h，OD_{600}最高，但仅为0.34（图4-C）。培养至96 h，上清液中NO_2^--N含量从20.00 mg/L降至0.04 mg/L，NO_2^--N

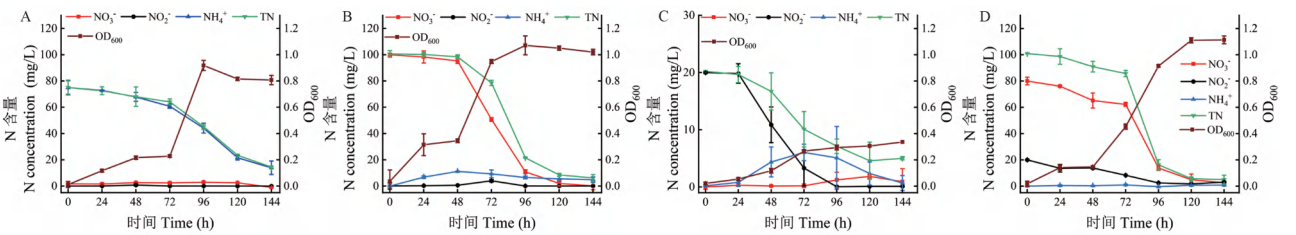


A：C/N和pH；B：C/N和盐度；C：pH和盐度

A: C/N and pH; B: C/N and salinity; C: pH and salinity

图3　三因素交互作用对NO_3^--N去除率影响的响应面分析

Fig. 3　Response surface analysis of the effects of three-factor interactions on NO_3^--N removal efficiency



A：NM；B：DM-1；C：DM-2；D：DM-3

图4　菌株2B在不同培养基上的生长及脱氮特性

Fig. 4　Growth and denitrification characteristics of strain 2B on different media

去除率为99.80%。培养过程中检测到96 h NO_3^--N最大累积浓度1.24 mg/L，之后逐渐降低至0.93 mg/L。NH_4^+-N在48 h内开始积累并在144 h降解完全。TN最终去除率为99.0%。

以NO_3^--N和NO_2^--N为混合氮源时（图4-D），菌株48 h后进入对数生长期，至120 h生长量达到最大值为1.11，随后进入稳定期。NO_3^--N含量在72–120 h由62.20 mg/L迅速降解至4.85 mg/L，NO_2^--N含量在48–120 h由13.80 mg/L降解至1.74 mg/L。培养至144 h时，NO_3^--N、NO_2^--N、TN的去除率分别为93.93%、91.3%、95.03%。

2.3.3　菌株的异养硝化好氧反硝化特性　以NO_3^--N、NO_2^--N和NH_4^+-N作为混合氮源（图5），菌株在48 h后进入对数生长期，并于120 h达到最大生长量，OD_{600}为0.984。整个过程中，培养液TN的浓度随培养时间均呈下降趋势，至144 h时，NO_3^--N、NH_4^+-N、NO_2^--N、TN含量为3.58、0.80、0.09、7.62 mg/L，氮去除率分别为92.80%、98%、99.1%、92.38%。以

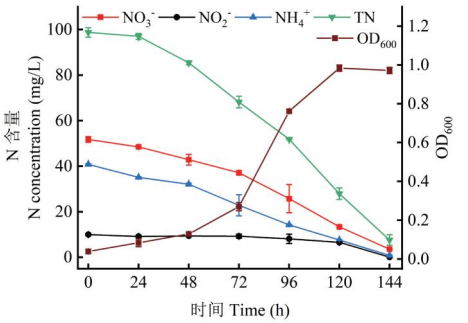


图5 菌株2B的生长及异养硝化好氧反硝化特性

Fig. 5 Growth and simultaneous nitrification and denitrification characteristics of strain 2B

上结果表明，菌株能够同步高效去除NO_3^--N、NH_4^+-N、NO_2^--N，展现出良好的异养硝化好氧反硝化能力。

2.4 菌株2B氮平衡分析

氮平衡分析结果（表1）表明，菌株以NH_4^+-N为唯一氮源时，约有（30.92±0.17）%的NH_4^+-N通过硝化作用转化为含氮气体（如N_2O或N_2），而（49.55±0.16）%的NH_4^+-N转化为细胞内生物氮。以NO_3^--N、NO_2^--N分别为唯一氮源时，有（18.34±0.14）%的NO_3^--N和（16.10±0.29）%的NO_2^--N通过反硝化作用转化为含氮气体，（81.13±0.11）%和（60.09±0.21）%的氮转化为细胞内生物氮。

表1 菌株的氮平衡分析

Table 1 Nitrogen balance of the strain

氮源 Nitrogen resource	初始总氮浓度 TN_i（mg/L）	培养液总氮浓度 TN_t（mg/L）	上清液总氮浓度 TN_s（mg/L）	胞内氮转化率 Re_{in}（%）	气态氮转化率 Re_g（%）
NO_3^--N	100.66±0.21	82.19±0.20	0.53±0.26	81.13±0.11	18.34±0.14
NO_2^--N	21.05±0.13	17.66±0.18	5.01±0.18	60.09±0.21	16.10±0.29
NH_4^+-N	74.19±0.17	51.2±0.17	14.49±0.22	49.55±0.16	30.92±0.17

2.5 菌株2B功能基因分析

全基因组测序分析结果表明，该菌株基因组共编码4 248个基因，其中包括耐冷相关基因*katG*，耐盐碱相关基因：*trk*、*groEL*、*treZ*、*treY*、*treS*、*otsA*、*gdhA*、*proA*、*proB*、*dnaK*以及与脱氮相关的基因：*nrtA*、*nrtB*、*narK*、*napA*、*napB*、*nirS*、*norB*、*norC*、*nosZ*、*nasA*、*nirB*、*nirD*、*nasD*、*nasE*、*glnA*、*gltB*、*gltD*，序列比对结果见附表3。结合KEGG代谢通路，推断菌株2B的脱氮途径如下（图6）：NO_3^--N和NO_2^--N通过*narK*编码的硝酸盐/亚硝酸盐转运蛋白（NarK）或由*nrtA*编码的底物结合蛋白（NrtA）和*nrtB*编码的通透酶蛋白（NrtB）组成硝酸盐/亚硝酸盐转运系统进入细胞，NO_3^--N经*nasA*编码的硝酸盐还原酶催化亚基（NasA）或*napA*、*napB*共同编码的硝酸盐还原酶（NapAB）催化生成NO_2^--N，随后依次在*nirS*编码的亚硝酸盐还原酶（NirS）、*norB*、*norC*编码的一氧化氮还原酶（NorBC）、*nosZ*编码的一氧化二氮还原酶（NosZ）作用下还原为N_2。其好氧反硝化途径为NO_3^--N→NO_2^--N→NO→N_2O→N_2。NO_2^--N经*nirB*、*nirD*编码的亚硝酸盐还原酶（NirBD）或*nasD*、*nasE*共同编码的亚硝酸盐还原酶（NasDE）催化生成NH_4^+。其硝酸盐与亚硝酸盐同化代谢路径为：NO_3^--N→NO_2^--N→NH_4^+-N。胞外的NH_4^+-N借助AMT家族转运蛋白进入细胞内，在*glnA*编码的谷氨酰胺合成酶（GlnA）的作用下生成L-谷氨酰胺，随后由*gltB*、*gltD*共同编码的谷氨酸合成酶（GltBD）催化生成L-谷氨酸。其途径为NH_4^+-N→L-谷氨酰胺→L-谷氨酸。

2.6 菌株2B对养殖尾水的脱氮效果

由图7-A可知，整个培养期间，空白对照的NO_3^--N、TN含量无明显变化，OD_{600}虽有微弱上升，

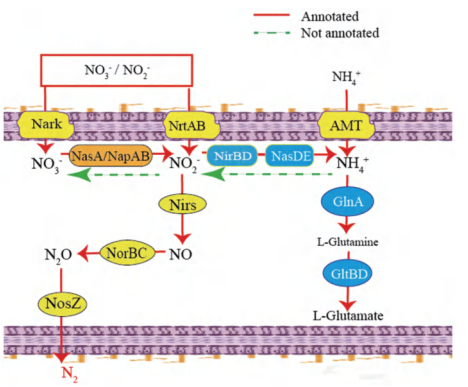
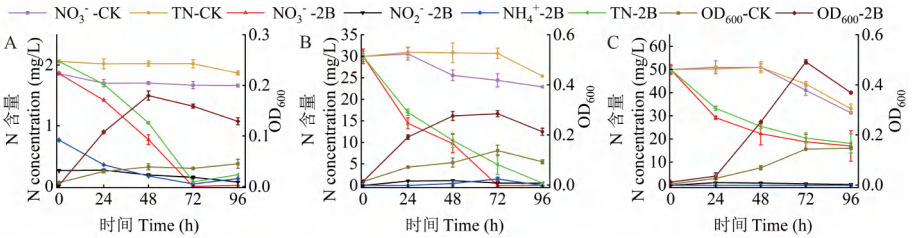


图6 菌株2B氮代谢途径

Fig. 6 Nitrogen metabolism pathways of strain 2B

但始终接近0。与之相比，接种菌株2B后，其OD_{600}在48 h内迅速增长至峰值0.18，表明菌株能够在大菱鲆养殖尾水中正常生长繁殖。在此期间，NO_3^--N、NO_2^--N、NH_4^+-N均快速下降，培养至72 h时，NO_3^--N、NO_2^--N、NH_4^+-N和TN含量最低，分别为0.10、0.15、0.04和0.79 mg/L，说明菌株在无外加碳源的条件下具备硝化反硝化能力。72 h后，培养液中NH_4^+-N和TN含量有所回升，可能是由于菌体死亡，菌体胞内物质溢出造成的。

在额外添加NO_3^--N含量为30 mg/L的养殖尾水中，其脱氮效果见图7-B。空白对照培养基的OD_{600}从0.014增长至最大值0.138（72 h），随后下降。尾水中NO_3^--N、TN含量下降至22.90 mg/L和25.40 mg/L，其去除率分别为23.67%和15.33%，说明尾水中自有微生物具有微弱的氮降解能力。接种菌株2B后，在48 h进入稳定期，OD_{600}达到最大值（0.285）；NO_3^--N和TN含量随培养时间延长呈下降趋势，在96 h时NO_3^--N去除率近100%，TN去除率为98.13%，展现了优秀的脱氮性能。整个培养过程中，NO_2^--N、NH_4^+-N浓度低于1.50 mg/L且无明显变化。额外添加NO_3^--N含量为50 mg/L的体系（图7-C），接种菌株2B的NO_3^--N和TN去除率分别为66.0%和63.80%，明显高于空白对照组，整个培养过程中NO_2^--N和NO_3^--N无明显积累。



A：未额外添加氮源；B：30 mg/L NO_3^--N；C：50 mg/L NO_3^--N

A: Without added nitrogen source; B: 30 mg/L NO_3^--N; C: 50 mg/L NO_3^--N

图7　菌株2B对不同大菱鲆尾水处理结果

Fig. 7　Nitrogen removal from different turbot effluents by strain 2B

3　讨论

为解决北方冬季海水养殖尾水高盐度、pH偏碱导致生物脱氮效率低下，本研究筛选出一株耐低温、耐盐碱的好氧反硝化菌株*S. stutzeri* 2B。区别于多数依赖有机酸或盐类的反硝化菌株[20–21]，菌株2B能以淀粉为碳源，且在C/N为5时保持较高的脱氮效率，有望降低养殖尾水处理成本。该菌株属于中度嗜碱菌，能耐受pH 11的碱度，在3%盐度时培养96 h，NO_3^--N去除率达87.72%，明显高于*Pseudomonas Stutzeri* HK13[14]和*Stutzerimonas degradans* BP[16]。响应面分析表明，在C/N=5，盐度3%，pH 8，转速为100 r/min最佳发酵条件下，菌株对NO_3^--N的去除率达99.80%，展现其在低温、低C/N、中高盐度、碱性条件下的脱氮能力。全基因组分析未发现菌株的耐冷基因（*cspA*和*capA*）[22]，但存在过氧化氢酶–过氧化物酶基因（*katG*），与模式菌株*S. stutzeri*（ATCC 14405）耐冷功能基因*katG*相似度为98.81%，其低温抗性可能依赖该基因编码的过氧化氢酶–过氧化物酶（catalase-peroxidase）分解胞内产生的H_2O_2，降低ROS对细胞的氧化损伤[23]，这与*Aeromonas hydrophila*的低温抗性相似[24]。同时该菌株具有10个与耐盐碱相关的功能基因，推测其调节机制：钾离子转运蛋白Trk参与K^+的吸收与转运，降低细胞内Na^+毒性，增强菌株的耐盐性；基因*treZ*、*treY*、*treS*与*otsA*可协同催化合成海藻糖，调节菌株耐盐碱性能[19]，该现象在*P. stutzeri* RAS-L11也得到验证[25]，其中*treS*与*P. stutzeri*（CCUG 29243）的*treS*相似度高达99.25%；基因*gdhA*和*proAB*催化合成谷氨酸和脯氨酸，可缓解细胞在高盐碱环境下的渗透胁迫，与*Ralstonia solanacearum*[26]和*Oceanobacillus picturae* DY09[27]相一致。此外，编码热休克蛋白基因*dnaK*与模式菌株*S. stutzeri*（NCIMB 885）的相应基因相似度达97.36%，反映菌株核心遗传背

景，该基因与*groEL*在盐碱胁迫条件下可发挥蛋白质修复功能，保障细胞稳定生长[28]。

全基因组分析显示菌株2B具有多个脱氮相关基因。BLAST比对分析，基因*nrtA*、*narK*、*napA*、*napB*、*nirS*、*norB*、*norC*、*nirB*、*nirD*、*nasD*、*glnA*、*gltB*、*gltD*、*nrtB*和*nasE*与同属同种*S. stutzeri*（*P. stutzeri*与*S. stutzeri*为同一种属不同名称）菌株的相应功能基因相似度最高，基因*nasA*、*nosZ*分别与同属不同种的*S. kunmingensis*、*S. chloritidismutans*菌株的相应基因相似度最高。

菌株2B具备完整的反硝化途径，结合脱氮特性及氮平衡分析，其能将NO_3^--N还原为NO_2^--N，进一步还原成含氮气体，这与*P. stutzeri* KK99[14]、*P. stutzeri HK13*[29]和*P. stutzeri* NP3[30]一致。此外，该菌株存在硝酸盐/亚硝酸盐转运蛋白（NarK）和由*nrtA*、*nrtB*编码的硝酸盐/亚硝酸盐转运系统（NrtAB），提高了菌株在不同条件下氮源摄取率，类似现象在*P. stutzeri* PCN-1中亦有报道[31]。

铵同化途径为胞外NH_4^+-N借助AMT家族进入细胞，在谷氨酰胺合成酶（GlnA）作用下生成L-谷氨酰胺，随后由谷氨酸合成酶（GltBD）生成L-谷氨酸，供给菌体生长，这与菌株*Burkholderia* sp. ZH8和*Halomonas* sp. H36基本一致[32-33]。以NH_4^+-N为唯一氮源时，胞内氮转化率为（49.55±0.16）%，且菌液OD_{600}最大值为0.92。菌株2B也存在硝酸盐与亚硝酸盐同化路径。经亚硝酸盐还原酶（NirBD）或硝酸盐还原酶（NasDE）催化，NO_2^--N生成NH_4^+，随后进入铵同化途径，这与*P. stutzeri* RAS-L11菌株[25]代谢路径类似。以NO_3^--N或NO_2^--N为唯一氮源时，胞内氮转化率分别为（81.13±0.11）%和（60.09±0.21）%，且脱氮过程中都有NH_4^+的生成。

此外，菌株2B以NH_4^+-N为唯一氮源时，约有（30.92±0.17）%的NH_4^+-N转化为含氮气体，在脱氮性能中检测到NO_3^--N的积累，说明其存在硝化途径。然而全基因组分析未发现相关硝化基因（如*amo*、*hao*），推测菌株可能通过其他酶类实现NH_4^+-N的氧化，随后进入反硝化途径，类似现象在*Stutzerimonas frequens* TF18[34]和*Acinetobacter oleivorans* AHP123[35]亦有报道，但具体机制不明。

将菌株2B应用于大菱鲆海水养殖尾水处理，3种无机氮和TN几乎被完全降解。即使在氮含量为30 mg/L的尾水中，NO_3^--N去除率接近100%、TN去除率98.13%，且无NO_2^--N明显积累，有效避免二次污染，证实了菌株的养殖尾水处理能力。本研究不仅丰富了微生物脱氮资源库，而且为低温水产养殖尾水的生物脱氮处理提供了理论依据。

4 结论

从海水养殖尾水中分离筛选得到一株耐冷耐碱施氏假单胞菌*S. stutzeri* 2B。菌株可耐受pH 11的碱性条件，且在淀粉为碳源、C/N=5、初始NO_3^--N含量为100 mg/L、盐度3%、pH=8、转速为100 r/min、10 ℃条件下，能够实现99.80%的NO_3^--N去除率，且代谢过程中无明显NO_2^--N、NH_4^+-N的积累。同时具备异养硝化好氧反硝化能力。该菌在大菱鲆海水养殖尾水脱氮处理中展现出优异的复合环境适应性与高效脱氮能力，推测其存在的脱氮途径为反硝化、铵同化和硝化作用。

文章所有附图附表请点击链接查看（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260515142458_NewsFile_44.pdf）

参考文献

[1] Shu H, Sun HM, Huang W, et al. Nitrogen removal characteristics and potential application of the heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria *Pseudomonas mendocina* S16 and *Enterobacter cloacae* DS′5 isolated from aquaculture wastewater ponds [J]. Bioresour Technol, 2022, 345: 126541.

[2] Deng ZX, Sun CD, Ma GY, et al. Anaerobic treatment of nitrogenous industrial organic wastewater by carbon-neutral processes integrated with anaerobic digestion and partial nitritation/anammox: Critical review of current advances and future directions [J]. Bioresour Technol, 2025, 415: 131648.

[3] 赵凯杰, 吴磊, 姜娥梅, 等. 紫外活化乙醇工艺还原硝酸盐的影响因素及动力学分析 [J]. 净水技术, 2024, 43(3): 99-109.
Zhao KJ, Wu L, Jiang EM, et al. Influence factors and kinetics analysis of nitrate reduction by UV/C_2H_5OH/N_2 process [J]. Water Purif Technol, 2024, 43(3): 99-109.

[4] 赵远哲, 董伟羊, 王海燕, 等. 芦竹-砾石A/O生物滤池对农村污水强化脱氮效能的研究 [J]. 环境工程技术学报, 2020, 10(3): 424-432.
Zhao YZ, Dong WY, Wang HY, et al. Study on advanced nitrogen removal efficiency of *Arundo donax*-gravel A/O biofilter for rural

sewage treatment [J]. J Environ Eng Technol, 2020, 10(3): 424-432.

[5] Robertson LA, Kuenen JG. Aerobic denitrification: a controversy revived [J]. Arch Microbiol, 1984, 139(4): 351-354.

[6] 沈桐, 江进, 李宁, 等. 好氧反硝化细菌及其在微污染水源水修复中的应用研究进展 [J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 465-482.
Shen T, Jiang J, Li N, et al. Aerobic denitrifiers and the application in remediation of micro-polluted water source [J]. Acta Microbiol Sin, 2023, 63(2): 465-482.

[7] Feng LJ, Yang JY, Yu H, et al. Response of denitrifying community, denitrification genes and antibiotic resistance genes to oxytetracycline stress in polycaprolactone supported solid-phase denitrification reactor [J]. Bioresour Technol, 2020, 308: 123274.

[8] de Almeida Fernandes L, Pereira AD, Leal CD, et al. Effect of temperature on microbial diversity and nitrogen removal performance of an anammox reactor treating anaerobically pretreated municipal wastewater [J]. Bioresour Technol, 2018, 258: 208-219.

[9] Huang H, Ekama GA, Biswal BK, et al. A new sulfidogenic oxic-settling anaerobic (SOSA) process: The effects of sulfur-cycle bioaugmentation on the operational performance, sludge properties and microbial communities [J]. Water Res, 2019, 162: 30-42.

[10] Ren JL, Cheng XW, Ma HJ, et al. Characteristics of a novel heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterium and its bioaugmentation performance in a membrane bioreactor [J]. Bioresour Technol, 2021, 342: 125908.

[11] Gao LJ, Wang WY, Huang X, et al. Stage-specific FeS-mediated regulation of *Paracoccus denitrificans* during carbon consumption by machine learning-assisted comparative proteomics [J]. Environ Res, 2026, 292: 123636.

[12] 许敬轩, 尹鹏, 刘凤坤, 等. 耐盐产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)WM27的特征、脱氮性能及固定化 [J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2530-2544.
Xu JX, Yin P, Liu FK, et al. Characteristics, denitrification performance, and immobilization of *Klebsiella oxytoca* WM27 [J]. Microbiol China, 2025, 52(6): 2530-2544.

[13] 董怡华, 张雪莹, 邹立安, 等. 耐低温好氧反硝化菌*Aeromonas* sp. 的分离鉴定及脱氮条件优化 [J]. 微生物学报, 2022, 62(6): 2038-2052.
Dong YH, Zhang XY, Zou LA, et al. Isolation and identification of a cold-tolerant and aerobic denitrifying bacterium *Aeromonas* sp. and optimization of denitrification conditions [J]. Acta Microbiol Sin, 2022, 62(6): 2038-2052.

[14] 韩冰, 丁雷, 史沐, 等. 一株高效嗜碱反硝化菌的分离鉴定及其脱氮特性研究 [J]. 环境科学研究, 2020, 33(9): 2129-2137.
Han B, Ding L, Shi M, et al. Identification and characterization of an alkalophilic *Pseudomonas stutzeri* strain with high denitrification capacity [J]. Res Environ Sci, 2020, 33(9): 2129-2137.

[15] 董文迅, 李俊峰, 滕峪, 等. 一株耐盐耐冷异养硝化-好氧反硝化菌的脱氮特性 [J]. 环境科学与技术, 2023, 46(7): 1-7.
Dong WX, Li JF, Teng Y, et al. Nitrogen removal characteristics of a salt-tolerant and cold-tolerant heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium WD0301 [J]. Environ Sci Technol, 2023, 46(7): 1-7.

[16] 别绮雯, 王进, 马丁, 等. 一株耐盐反硝化菌的分离及脱氮特性 [J]. 环境科学与技术, 2025, 48(5): 97-109.
Bie QW, Wang J, Ma D, et al. Isolation and denitrification characteristics of a saline-tolerant denitrifying bacterial strain [J]. Environ Sci Technol, 2025, 48(5): 97-109.

[17] 彭秋瑜, 刘如玲, 李萌, 等. 序批式反应器改良工艺对海水养殖废水中氮和磺胺嘧啶去除及微生物群落分析 [J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2023, 53(12): 146-154.
Peng QY, Liu RL, Li M, et al. The study of nitrogen and sulfadiazine removal and the microbial community in modified sequencing batch reactor treating mariculture wastewater [J]. Period Ocean Univ China, 2023, 53(12): 146-154.

[18] Gao Y, Zhu JW, Wang KY, et al. Discovery of a heterotrophic aerobic denitrification *Pseudomonas* sp. G16 and its unconventional nitrogen metabolic pathway [J]. Bioresour Technol, 2023, 387: 129670.

[19] Yi MM, Wang H, Ma XN, et al. Efficient nitrogen removal of a novel *Pseudomonas chengduensis* strain BF6 mainly through assimilation in the recirculating aquaculture systems [J]. Bioresour Technol, 2023, 379: 129036.

[20] 蒋慧慧, 王强, 付维来, 等. 一株异养硝化-好氧反硝化细菌的筛选及氮转化特性研究 [J]. 生物技术通报, 2023, 39(12): 250-260.
Jiang HH, Wang Q, Fu WL, et al. Screening of a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium and its nitrogen transforming characterization [J]. Biotechnol Bull, 2023, 39(12): 250-260.

[21] 李传龙, 谢骏, 王广军, 等. 一株好氧反硝化菌 *Citrobacter portucalensis* ZS2的分离鉴定及脱氮性能研究 [J/OL]. 甘肃农业大学学报, 2025: 1-10. https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=GSND20251119002&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ.
Li CL, Xie J, Wang GJ, et al. Isolation and denitrification performance of an aerobic denitrifying bacterium *Citrobacter portucalensis* ZS2 [J/OL]. J Gansu Agric Univ, 2025: 1-10. https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=GSND20251119002&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ.

[22] Wu QF, He TX, Chen MP, et al. Elucidating the mechanisms underlying heterotrophic nitrification-aerobic denitrification and cold tolerance in *Pseudomonas fragi* EH-H1 under weakly acidic conditions [J]. Int Biodeterior Biodegrad, 2025, 200: 106046.

[23] Urmersbach S, Aho T, Alter T, et al. Changes in global gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* induced by cold- and heat-stress [J]. BMC Microbiol, 2015, 15: 229.

[24] 陈李维, 张梅梅, 张焦南, 等. sodA、sodB和KatG在嗜水气单胞菌抗氧化胁迫中的协同作用 [J]. 水产学报, 2021, 45(1):

136-146.
Chen LW, Zhang MM, Zhang JN, et al. Synergism of sodA, sodB and KatG in *Aeromonas hydrophila* under antioxidative stress [J]. J Fish China, 2021, 45(1): 136-146.

[25] Li WY, Huo R, Di YL, et al. Efficient nitrogen removal by the aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas stutzeri* RAS-L11 under triple stresses of high alkalinity, high salinity, and tetracycline: From performance to mechanism [J]. Bioresour Technol, 2025, 430: 132590.

[26] MacIntyre AM, Barth JX, Pellitteri Hahn MC, et al. Trehalose synthesis contributes to osmotic stress tolerance and virulence of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2020, 33(3): 462-473.

[27] Nie TY, Wang LQ, Liu YL, et al. A halophilic bacterium for bioremediation of saline-alkali land: the triadic and synergetic response mechanism of *Oceanobacillus picturae* DY09 to salt stress [J]. Microorganisms, 2025, 13(7): 1474.

[28] Li X, Wang YZ, Ma F, et al. Chaperone-mediated thermotolerance in hyperthermophilic composting: Molecular-Level protein remodeling of microbial communities [J]. Environ Sci Ecotechnol, 2025, 28: 100630.

[29] 康鹏亮, 陈胜男, 黄廷林, 等. 好/厌氧条件下反硝化细菌脱氮特性与功能基因 [J]. 环境科学, 2018, 39(8): 3789-3796.
Kang PL, Chen SN, Huang TL, et al. Denitrification characteristics and functional genes of denitrifying bacteria under aerobic or anaerobic conditions [J]. Environ Sci, 2018, 39(8): 3789-3796.

[30] 孟红艳, 杨垒, 李玉彩, 等. 异养硝化细菌 *Pseudomonas stutzeri* strain NP3的同步脱氮除磷特性及代谢机制 [J]. 中国环境科学, 2025, 45(4): 1901-1910.
Meng HY, Yang L, Li YC, et al. Simultaneous nitrogen and phosphorus removal characteristics and metabolic mechanism of heterotrophic nitriying bacterium *Pseudomonas stutzeri* strain NP3 [J]. China Environ Sci, 2025, 45(4): 1901-1910.

[31] Zheng MS, He D, Ma T, et al. Reducing NO and N_2O emission during aerobic denitrification by newly isolated *Pseudomonas stutzeri* PCN-1 [J]. Bioresour Technol, 2014, 162: 80-88.

[32] 李艳丽, 杨垒, 张志昊, 等. 好氧反硝化细菌 *Burkholderia* sp. ZH8的脱氮特性与生物强化作用 [J]. 中国环境科学, 2024, 44(8): 4282-4291.
Li YL, Yang L, Zhang ZH, et al. Nitrogen removal characteristics and bioenhancement effects of aerobic denitrifying bacteria *Burkholderia* sp. ZH8 [J]. China Environ Sci, 2024, 44(8): 4282-4291.

[33] Li YJ, Zhang LH, Liu WF, et al. Simultaneous removal of urea nitrogen and inorganic nitrogen from high-salinity wastewater by *Halomonas* sp. H36 [J]. Environ Sci Pollut Res, 2023, 30(2): 2544-2554.

[34] Liu TF, Wang BJ, Liu M, et al. Stutzerimonas frequens strain TF18 with superior heterotrophic nitrification-aerobic denitrification ability for the treatment of aquaculture effluent [J]. Process Biochem, 2023, 130: 156-165.

[35] Zhou XQ, Wang YL, Tan X, et al. Genomics and nitrogen metabolic characteristics of a novel heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium *Acinetobacter oleivorans* AHP123 [J]. Bioresour Technol, 2023, 375: 128822

（责任编辑　张婷婷）