

引用格式:

王峰, 刘木兰, 马肖, 张秋平. 油菜 *BnPMEI1* 基因的克隆及功能分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(1): 25–34.

WANG F, LIU M L, MA X, ZHANG Q P. Cloning and functional analysis of *BnPMEI1* gene in *Brassica napus*[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2023, 49(1): 25–34.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



油菜 *BnPMEI1* 基因的克隆及功能分析

王峰, 刘木兰, 马肖, 张秋平*

(湖南农业大学农学院, 湖南长沙 410128)

摘要: 以高抗菌核病的油菜品种湘油 15 和高感菌核病的油菜品种 98C40 为材料, 采用 RT-PCR 方法克隆 *BnPMEI1* 基因的编码区全长, 利用生物信息学软件和实时荧光定量 PCR 分析 *BnPMEI1* 的结构和表达特性, 并构建该基因超表达载体, 分析该基因的功能。序列分析结果表明, 该基因编码区全长 615 bp, 编码 204 个氨基酸, 具有 1 个信号肽和 1 个 PME1 结构域, 属于 PME1 家族基因, 命名为 *BnPMEI1*(GenBank 登录号为 ON254917)。表达分析结果表明, *BnPMEI1* 在根、茎、花、叶、角果皮和籽粒中均有表达, 在叶中的表达量最高, 根中的表达量最低; 湘油 15 的茎、叶、花中的表达量均显著高于 98C40 的。在核盘菌、茉莉酸甲酯(MeJA) 和水杨酸(SA)处理下, *BnPMEI1* 在湘油 15 中的表达上调, 在 98C40 中的表达则受到抑制; 乙烯处理下, *BnPMEI1* 在 2 个品种中的表达均下调, 在湘油 15 中下调的幅度更大; 离体叶片接种结果显示, 超表达 *BnPMEI1* 的油菜突变体叶片病斑明显小于野生型叶片的。综合分析, *BnPMEI1* 基因可能介导了 SA 和茉莉酸途径的调控, 诱导油菜菌核病抗性的提高。

关键词: 油菜; 核盘菌; 抗病性; 果胶甲酯抑制剂基因; 克隆

中图分类号: S565.4; Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2023)01-0025-10

Cloning and functional analysis of *BnPMEI1* gene in *Brassica napus*

WANG Feng, LIU Mulan, MA Xiao, ZHANG Qiuping*

(College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: To understand the expression characters of *BnPMEI1* gene in *Brassica napus* we cloned the gene from Xiangyou 15 with the high resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and 98C40 with high sensitivity to *S. sclerotiorum* by PCR. Then the sequences were subjected to bioinformatics analysis and expression in bacterial host. Sequence analysis showed that the coding region of the gene was full-length 615 bp, encoding 204 amino acids, with a signal peptide and a PME1 domain, belonging to the PME1 family gene, named *BnPMEI1*(GenBank accession number is ON254917). Expression analysis showed that *BnPMEI1* was expressed in root, stem, flower, leaf, pod skin and grain, but the expression was the highest in leaf and the lowest in root, and the expression in stem, leaf and flower of Xiangyou15 were significantly higher than those of 98C40. Under the treatment of *S. sclerotiorum*, methyl jasmonate(MeJA) and salicylic acid(SA), the expression of *BnPMEI1* in Xiangyou15 was up-regulated, while that in 98C40 was inhibited; under ethylene treatment, the expression of *BnPMEI1* in both varieties were down-regulated, and the down-regulation was more significant in Xiangyou15. The results of inoculation in vitro showed that the disease spot of rape mutants overexpressing

收稿日期: 2022-03-18

修回日期: 2022-05-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31601339); 湖南省自然科学基金面上项目(2021JJ30352); 湖南省教育厅项目(16C0780)

作者简介: 王峰(1981—), 男, 湖南长沙人, 博士, 副教授, 主要从事作物栽培与育种研究, 13130035@qq.com; *通信作者, 张秋平, 博士, 讲师, 主要从事油菜抗病机理研究, zhangqiuping@hunau.edu.cn

BnPMEI1 was significantly smaller than that of wild-type leaves. Comprehensive analysis showed that *BnPMEI1* gene might be regulated by SA and jasmonic acid pathway, which induced the resistance of *B. napus* to *S. sclerotiorum*.

Keywords: rape; *Sclerotinia sclerotiorum*; disease resistance; *BnPMEI1*; clone

菌核病是油菜三大病害之一^[1]。该病害在中国长江流域油菜主产区发生最为严重, 每年发病面积 $4.70 \times 10^6 \text{ hm}^2$, 造成产量损失 5%~25%, 直接经济损失数亿元^[2]。此外, 菌核病还会引起油菜种子脂肪酸、油酸等含量的变化, 降低总含油量, 影响油菜籽品质^[2]。

引起油菜菌核病的核盘菌是一种死体营养型真菌, 存在于 75 个科 600 多种寄主植物中^[3]。其寄主范围广, 且无明显致病力分化, 至今仍未找到有效的抗源。很多研究人员尝试通过导入外源基因来提高油菜的抗病性, 包括降解草酸的草酸氧化酶基因^[4]、草酸脱羧酶基因^[5], 破坏菌核菌细胞壁的几丁质酶基因^[6]、 β -1,3-葡糖苷酶基因^[7]、葡聚糖酶(Glucanase)基因^[8], 合成抗菌肽或者抗菌蛋白的基因以及启动植物防卫反应的转录因子或相关抗性基因, 如油菜的 *WRKY33*^[9]、*MPK4*^[10]和 *BnMAPK1*^[11], 诸葛紫的 *ovd*^[12], 土豆的 *Avr9* 和 *Cj9*^[13], 菜豆的防御基因 *DRR206*^[14]等。这些基因都能不同程度地延缓菌核菌对油菜的侵染, 或者提高油菜的耐病能力。本研究基于转录组数据筛选到的高抗和高感菌核病油菜品种中差异表达序列, 克隆了果胶甲酯抑制剂基因 *BnPMEI1* 的编码区全长, 采用生物信息学软件对基因序列特征进行了分析, 研究了该基因在不同抗性品种中的组织表达和诱导表达特性, 同时构建了基因的超表达载体并获得超表达突变体, 旨在挖掘油菜的菌核病抗病基因, 为解析油菜菌核病抗性的分子机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试油菜品种为湘油 15、98C40 和 Westar, 由湖南农业大学油料作物研究所提供; 核盘菌菌核收集于湖南农业大学耘园基地, 通过消毒、纯化后保存; RNA 提取 Kit、第一链 cDNA 合成试剂

盒、qPCR PreMix、琼脂糖和核酸染料购自天根生化科技有限公司; 96 孔 PCR 板及封板膜购于莫纳生物科技有限公司。

1.2 采用的引物

利用 Primer 5 进行引物设计, 其中基因克隆的引物根据转录组差异表达基因(BnaC09g13100D)序列设计, 为 13100-F 和 13100-R; *BnPMEI1* 荧光定量分析的引物为 BnPMEI1-qRTF 和 BnPMEI1-qRTR; 内参基因 *Actin* 的引物为 BnACT-qRTF 和 BnACT-qRTR; 过表达载体阳性克隆鉴定的引物为 13100-F 和 PCB-seqR; 转基因阳性苗 PCR 检测的引物为 BnPMEI1TP-F 和 BnPMEI1TP-R; 抗性相关基因 *BnNPR1*、*BnLOX2*、*PDF1.2*、*BnCHB4* 的荧光定量 PCR 上游引物分别为 BnNPR1-F、BnLOX2-F、PDF1.2-F、BnCHB4-F, 下游引物分别为 BnNPR1-R、BnLOX2-R、PDF1.2-R、BnCHB4-R。引物的具体序列信息见表 1。

表 1 试验所用引物序列

Table 1 Sequences of primers for the experiments

引物名称	引物序列(5'-3')
13100-F	GGCAGCCAAGTTCATCAAG
13100-R	AACATCCGACATAACCATCTCA
BnPMEI1-qRTF	GCAGCCAAGTTCATCAAG
BnPMEI1-qRTR	ATCCGACATAACCATCTCAA
BnACT-qRTF	CTGGAATTGCTGACCGTATGAG
BnACT-qRTR	ATCTGTTGAAAAGTGCTGAGGG
PCB-seqR	GCACCCAGGCTTTACACTT
BnPMEI1TP-F	GAAGTGCTTGACATTGGGGAGT
BnPMEI1TP-R	AGATGTTGGCGACCTCGTATT
BnNPR1-F	AGGACTTGACTATACTGGCTCTC
BnNPR1-R	TTGGATGTGGAAGAAGACGAAG
BnLOX2-F	TACGCCTCACGATACCAGATT
BnLOX2-R	TTCCTCACTTCACTCCACCAT
PDF1.2-F	CTTCTCTCGCTGCTCTTGT
PDF1.2-R	GATCCATGTTGTGCTCCTTCA
BnCHB4-F	CAACCCAAGTGTGCTTCA
BnCHB4-R	CACCGTTACTCCATTCCATT

1.3 方法

1.3.1 基因克隆

以湘油 15 和 98C40 的叶片 cDNA 为模板, 用天根生化科技有限公司的高保真酶进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物连接到克隆载体, 转化大肠埃希菌, 筛选阳性克隆进行测序。

1.3.2 生物信息学分析

序列比对采用 DNAMAN 7.0; 蛋白质序列分析采用 ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>); 疏水性分析采用 ProtScale(<https://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl/>); 跨膜结构预测采用 TMHMM-2.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>); 信号肽预测采用 SignalP 6.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP>); 二级结构预测采用 SOMPA(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)。

1.3.3 材料处理

将湘油 15、98C40 种子播种至含营养土的花盆中, 置于光照培养箱(25 °C、相对湿度 60%~90%)培养至 6 叶期后, 分别进行接种处理和激素胁迫处理。核盘菌接种处理: 将冰箱中保存的核盘菌进行活化后, 置于 PDA 培养基进行暗培养, 待菌丝长满平板后, 用直径为 5 mm 的打孔器取菌丝块紧贴于叶片上, 用保鲜膜包裹固定和保湿, 置于光照培养箱(24 °C、相对湿度 95%)。激素胁迫处理: 分别用 1 mmol/L 的水杨酸(SA)、0.1 mmol/L 茉莉酸甲酯(MeJA)和 0.1 mmol/L 的乙烯前体(ACC)喷施于油菜叶片, 对照组喷洒双蒸水。上述每个处理植株为 6 株, 设 3 次生物学重复。

1.3.4 *BnPMEI1* 的表达量检测

在盛花期, 各取 3 株湘油 15、98C40, 分别将根、茎、叶、花、角果皮和籽粒置于-80 °C 冰箱保存。按照植物 RNA 提取 Kit 说明书, 提取各部位

总 RNA。用酶标仪检测 RNA 质量和浓度, 同时用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量。选择条带清晰且 OD_{260/280} 值为 1.8~2.0 的 RNA 溶液, 按照 cDNA 第一链合成试剂盒说明书进行反转录。以油菜 *Actin* 基因作为内参基因, 用 CFX96TM 荧光定量 PCR 系统进行 qRT-PCR, 分析 2 个品种不同部位 *BnPMEI1* 的表达量。每个模板设置 3 次重复。

1.3.5 过表达载体的构建及农杆菌介导转化

将 pC1300s 载体用 *SacI* 与 *BamHI* 双酶切处理并回收, 与获得的扩增产物进行重组后转化大肠埃希菌, 涂抗性平板, 挑选重组克隆子摇菌, 通过菌落 PCR 进行验证, 将验证为阳性的克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序后进行序列比对和分析, 将连接正确的过表达载体利用农杆菌介导法转化油菜 WESTAR, 对获得的抗性苗进行 PCR 鉴定, 获得阳性超表达植株。

1.3.6 过表达植株 *BnPMEI1* 表达量分析及抗病性鉴定

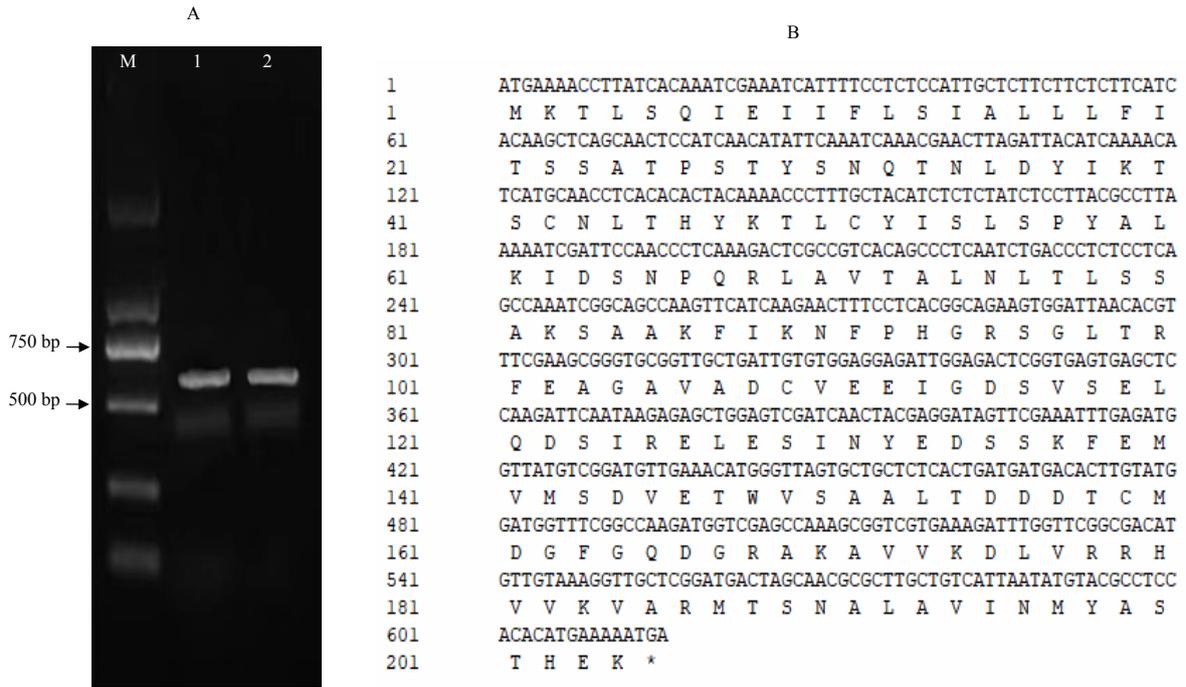
利用实时荧光定量 PCR, 以野生型 Westar 为对照, 分析油菜 *BnPMEI1* 基因在阳性苗中的表达情况。

抗病性鉴定采用离体叶片接种, 取转基因植株的叶片, 用核盘菌菌丝块接种, 接种方法同 1.2.3, 接种后 48 h 观察核盘菌的侵染情况。

2 结果与分析

2.1 *BnPMEI1* 的编码区全长克隆

分别以湘油 15 和 98C40 的 cDNA 为模板, 根据 NCBI 数据库中 *BnaC09g13100D* 的核苷酸序列设计上、下游引物, 2 个品种均扩增出单一的条带(图 1-A)。测序结果显示, 该基因编码区(CDS)全长 615 bp, 编码 1 个含 204 氨基酸残基的蛋白质, 将该基因命名为 *BnPMEI1*, 并在 GenBank 登录(登录号为 ON254917)。



A 为 PCR 扩增结果, M 为 DNA Marker(DL2000), 泳道 1 为 98C40, 泳道 2 为湘油 15; B 为 *BnPME11* 的核苷酸和氨基酸序列。

图 1 *BnPME11* 扩增结果及核苷酸和氨基酸序列

Fig.1 Gene amplification results and nucleotide and amino acid sequences of *BnPME11*

2.2 *BnPME11* 编码蛋白的生物信息学分析

2.2.1 *BnPME11* 编码蛋白质的一级结构

运用 ProtParam 工具对 *BnPME11* 编码的蛋白质进行基本理化性质预测, 蛋白质组成为 $C_{986}H_{1581}N_{263}O_{314}S_{10}$, 相对分子质量为 22 460, 理

论等电点(PI)为 5.57, 蛋白质由 20 种氨基酸残基组成, 其中丝氨酸(Ser)占 11.8%, 亮氨酸(Leu)和丙氨酸(Ala)分别占 9.8%和 9.3%(表 2); 其不稳定系数为 42.47, 平均亲水系数为-0.048, 推测其为不稳定水溶性蛋白质。

表 2 油菜 *BnPME11* 编码蛋白质的氨基酸组成

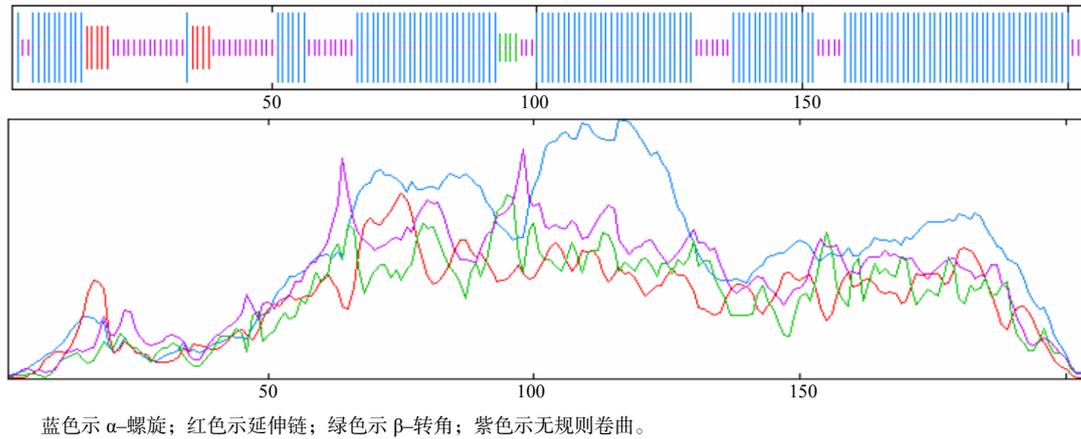
Table 2 Amino acid composition of proteins encoded by *BnPME11* in *Brassica napus*

氨基酸	数量	比例/%	氨基酸	数量	比例/%
Ala(A)	19	9.3	Leu(L)	20	9.8
Arg(R)	8	3.9	Lys(K)	12	5.9
Asn(N)	9	4.4	Met(M)	6	2.9
Asp(D)	13	6.4	Phe(F)	7	3.4
Cys(C)	4	2.0	Pro(P)	4	2.0
Gln(Q)	5	2.5	Ser(S)	24	11.8
Glu(E)	11	5.4	Thr(T)	16	7.8
Gly(G)	7	3.4	Trp(W)	1	0.5
His(H)	4	2.0	Tyr(Y)	7	3.4
Ile(I)	13	6.4	Val(V)	14	6.8

2.2.2 *BnPME11* 编码蛋白质的二级结构

通过 SOPMA 对甘蓝型油菜 *BnPME11* 编码的蛋白质的二级结构进行预测。结果(图 2)显示, *BnPME11* 蛋白由 α -螺旋、 β -转角、延伸链和无规

则卷曲构成。其中占比最高的是 α -螺旋, 为 66.67%, 其次是无规则卷曲, 为 26.96%, 占比较低的是延伸链和 β -转角, 分别为 4.41%和 1.96%。



蓝色示 α -螺旋；红色示延伸链；绿色示 β -转角；紫色示无规则卷曲。

图 2 *BnPMEI1* 基因编码蛋白质的二级结构

Fig.2 Secondary structure of the protein proteins encoded by *BnPMEI1* in *Brassica napus*

2.2.3 *BnPMEI1* 编码蛋白质的功能结构域分析

采用 TMHMM 在线软件分析 *BnPMEI1* 编码蛋白质的跨膜结构, 结果显示, *BnPMEI1* 编码蛋白存在跨膜结构, 其中 1~6 aa 位于膜内, 7~29 aa 为

跨膜区, 30~204 aa 位于膜外(图 3-A)。采用 SignalP 6.0 和 SMART 分析其信号肽和功能结构域, 该蛋白含有 1 个信号肽(1~30 aa), 剪切位点位于 14~15 aa; 含有 1 个 PME1 结构域(33~194 aa) (图 3-B)。

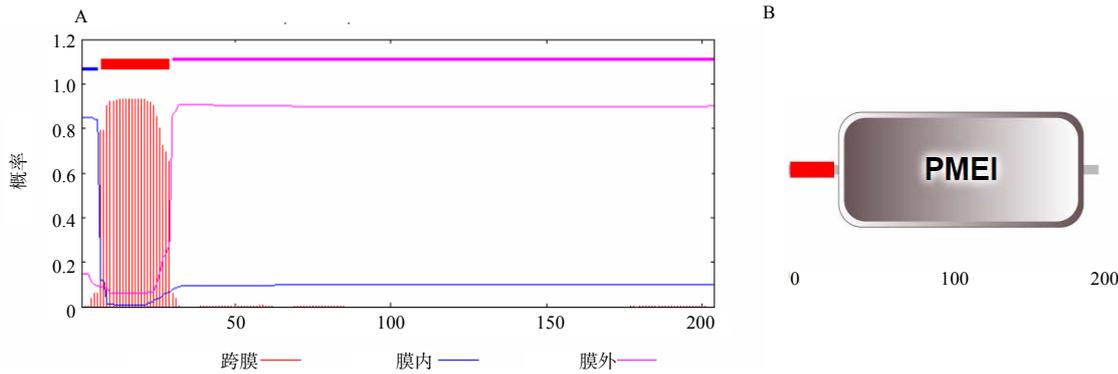


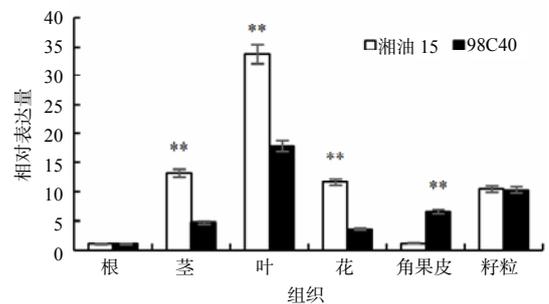
图 3 *BnPMEI1* 编码蛋白质的跨膜结构和功能结构域

Fig.3 The transmembrane structure and function domain of proteins encoded by *BnPMEI1* gene

2.3 *BnPMEI1* 的表达特性分析

2.3.1 *BnPMEI1* 的组织表达特性

采用实时荧光定量 PCR 分析了 *BnPMEI1* 在 2 个油菜品种各部位的表达特性。结果(图 4)显示: *BnPMEI1* 在油菜根、茎、叶、花、角果皮、籽粒中都有表达, 在叶中的表达量最高, 在茎、籽粒、花、角果皮中的表达量依次减少, 在根中的表达量最低。湘油 15 茎、叶、花中的表达量均显著高于 98C40 的, 98C40 角果皮中的表达量显著高于湘油 15 的, 2 个品种根和籽粒中的表达量无显著差异。



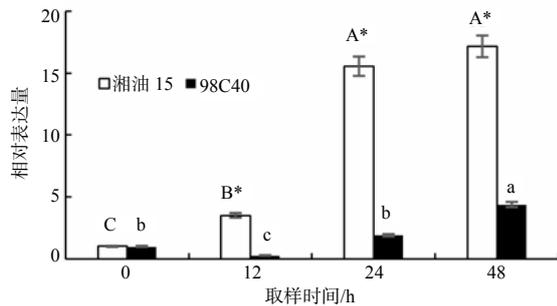
“***”表示 2 个品种在同一组织中的相对表达量的差异有统计学意义($P < 0.01$)。

图 4 油菜不同组织中 *BnPMEI1* 的相对表达量

Fig.4 Relative expression of *BnPMEI1* in different tissues of *Brassica napus*

2.3.2 *BnPME11* 在菌核菌诱导下的表达

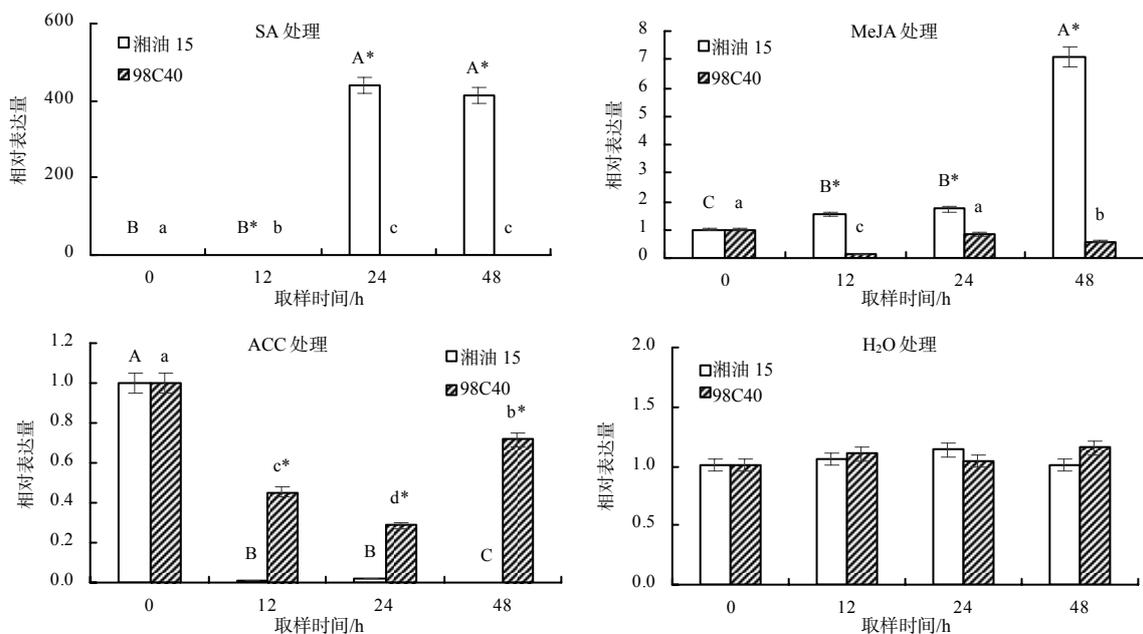
2个油菜品种接种菌核菌前和接种后12、24、48 h接种点周围叶片 *BnPME11* 表达量情况如图5所示。湘油15 *BnPME11* 的相对表达量随接种时间的延长而上调, 接种后12 h的表达量显著高于接种前, 接种后24 h和接种后48 h的表达量显著高于接种前和接种后12 h的; *BnPME11* 在98C40中的表达量表现为接种后12 h显著下调, 接种后24 h开始上调, 接种后48 h则显著高于接种前; 湘油15接种后12、24、48 h *BnPME11* 的



不同大写字母表示湘油15不同取样时间的表达量差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 不同小写字母表示98C40不同取样时间的表达量差异有统计学意义 ($P < 0.01$); “*”表示同一时间点不同品种表达量的差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

图5 油菜接种后不同时间点 *BnPME11* 的表达情况

Fig.5 Expression of *BnPME11* in *Brassica napus* at different time points



不同大写字母表示湘油15不同取样时间处理间的差异有统计学意义; 不同小写字母表示98C40不同取样时间处理间的差异有统计学意义 (SA处理为 $P < 0.001$, 其他处理为 $P < 0.05$); “*”表示同一时间点不同品种间的差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

图6 不同激素处理下 *BnPME11* 的表达情况

Fig.6 Expression of *BnPME11* in *Brassica napus* under different hormone treatments

表达量分别是98C40的12.5、8.1和3.9倍, 均显著高于98C40。

2.3.3 SA处理对 *BnPME11* 表达的影响

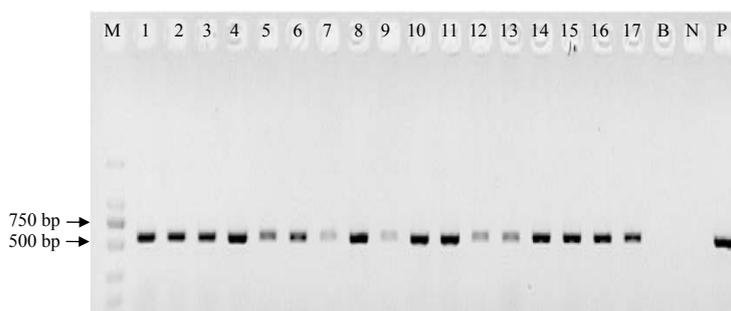
以H₂O为对照, 分析喷施SA、MeJA和ACC处理对 *BnPME11* 表达的影响。结果(图6)显示, SA、MeJA对 *BnPME11* 的表达均有影响, 但对不同抗性品种的影响不同。SA处理下, 湘油15中 *BnPME11* 的相对表达量在处理24 h显著提高, 处理后48 h开始下降, 且处理后24 h和48 h均极显著高于处理前和处理后12 h; 98C40中 *BnPME11* 的表达则受到抑制, 处理后各时间点的表达量均显著低于处理前。MeJA处理下, 湘油15中 *BnPME11* 的相对表达量呈逐渐上升趋势, 处理后各时间点的表达量均显著高于接种前, 且接种48 h的表达量最高, 显著高于其他时间点; 98C40中处理后12 h的 *BnPME11* 的相对表达量显著低于处理前, 处理后24 h的表达量显著高于处理后12 h和48 h, 但与处理前没有显著差异。ACC处理在湘油15和98C40中均表现为抑制 *BnPME11* 基因的表达。其中, 湘油15在处理24 h后 *BnPME11* 的表达量下降, 且处理后各时间点的表达量均极显著低于处理前的; 98C40中的 *BnPME11* 则表现为处

理后先下降再上升, 处理前的显著高于处理后各时间点的, 处理后 24 h 的表达量最低, 显著低于其他各时间点的, 处理后 48 h 的则显著高于处理 12 h 和 24 h 的。

2.4 过表达载体的构建及农杆菌介导转化

构建 *BnPME11* 的过表达载体, 活化农杆菌后, 切取受体品种 Westar 的下胚轴, 用农杆菌浸

染后共培养; 将外植体转移至选择培养基上; 再将外植体转移至分化培养基上, 每 15 d 继代 1 次, 直至出芽; 分化出芽后, 切取芽苗转移至生根培养基, 最后将生根的再生苗转移到营养土中进行培养。取再生植株叶片, 利用 CTAB 法提取 DNA, 进行 PCR 检测(图 7), 获得 17 株阳性转基因植株。



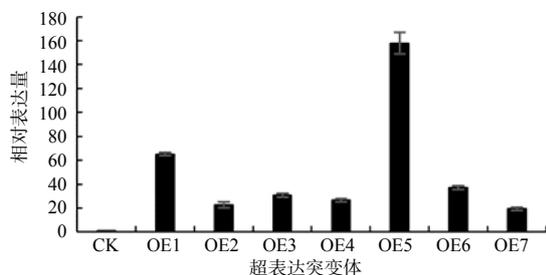
M 为 DNA Marker(DL2000); 泳道 1~17 转基因植株; B 空白对照; N 阴性对照; P 阳性对照。

图 7 转基因植株 PCR 检测结果

Fig.7 Results of PCR amplification of transgenic plants

2.5 过表达植株 *BnPME11* 突变体的抗病性鉴定

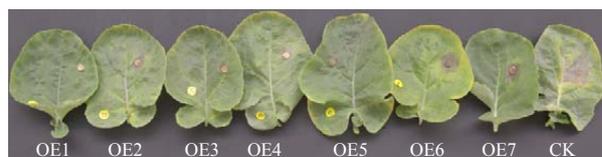
采用实时荧光定量 PCR 分析转基因植株叶片中 *BnPME11* 的表达情况, 鉴定出 7 株 *BnPME11* 表达量显著提高的突变体植株(图 8), 编号为 OE1、OE2、…、OE7, 其叶片中 *BnPME11* 的表达量是野生型 Westar 的 19.3~158.1 倍。以野生型 Westar 为对照, 取超表达突变体植株的叶片, 用带有菌核菌菌丝的琼脂糖块接种, 暗培养 48 h 后观察叶片上的病斑扩展情况。结果(图 9)显示, 超表达 *BnPME11* 的油菜叶片病斑明显小于野生型 Westar, 说明 *BnPME11* 的超表达有利于抑制菌核菌早期的侵染, 从而提高油菜的菌核病抗性。



CK 为野生型 Westar, OE1、OE2、…、OE7 为超表达 *BnPME11* 的突变体。

图 8 油菜叶片中 *BnPME11* 的相对表达量

Fig.8 Expression of *BnPME11* in rape leaves



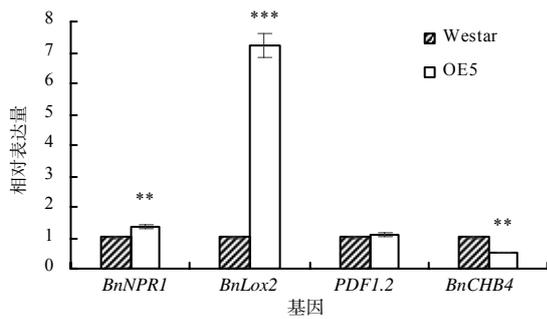
CK 为野生型 Westar; OE1、OE2、…、OE7 为超表达 *BnPME11* 基因的突变体。

图 9 离体叶片核盘菌接种结果

Fig.9 Results of inoculation of *Sclerotinia sclerotiorum* in isolated leaves

2.6 油菜菌核病抗病基因的作用机制分析

以野生型 Westar 为对照, 分析 *BnPME11* 表达量最高的 OE5 中油菜防御相关基因 *BnNPR1*、*BnLOX2*、*PDF1.2*、*BnCHB4* 的表达情况。结果(图 10)表明, 突变体植株中 *BnNPR1* 和 *BnLOX2* 的表达量显著高于野生型 Westar, *PDF1.2* 的表达没有显著差异, *BnCHB4* 的表达量则显著下降。说明 *BnPME11* 的超表达主要诱导了水杨酸信号途径下游相关防御基因的表达, 同时也可以诱导茉莉酸合成相关基因的表达。



“***”“**”分别表示突变体植株和野生型植株中相关基因的相对表达量的差异有统计学意义($P<0.01$ 、 $P<0.001$)。

图 10 防御相关基因的相对表达量

Fig.10 Relative expression of defense-related genes

3 结论与讨论

果胶是一种结构复杂的多糖,占双子叶和非禾本科单子叶植物初生细胞壁的30%左右,其主要成分为同型半乳糖醛酸(HGA),它在维持细胞壁结构完整性以及细胞间黏附和信号转导等方面发挥重要作用^[15]。果胶的降解对死体营养型真菌成功入侵寄主植物非常重要^[16]。果胶甲酯酶(PME)是一种参与果胶代谢的酶,主要催化HGA被内切多聚半乳糖醛酸酶等水解酶降解,从而导致细胞壁的软化^[17]。而果胶甲酯酶抑制剂(PMEI)可以调节PME的活性,从而影响细胞壁对微生物内多聚半乳糖醛酸酶的敏感性,在植物生长发育和病害防御等方面具有重要作用^[18-19]。研究发现,在拟南芥中结构性表达基因*AtPMEI-1*和*AtPMEI-2*可以提高其果胶甲酯化程度约16%,且果胶的细微结构存在差异,增强了拟南芥对灰霉病菌的抗性^[20];在拟南芥中超表达*GbPMEI13*可促进拟南芥的生长并增强对大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)的抗性^[21];在烟草中过表达猕猴桃果胶甲酯酶抑制基因*AcPMEI*能够抑制PME活性,增强细胞壁甲酯化,从而限制烟草花叶病毒在烟草细胞间的运动;过表达*AtPMEI-2*的拟南芥植株对芜菁脉明病毒(TVCV)易感性降低^[22]。

本研究根据高抗和高感油菜转录组数据中筛选到差异表达序列信息,从油菜中克隆了果胶甲酯酶抑制剂基因*BnPMEI1*的编码区全长,采用生物信息学软件对其序列特征进行了分析,并且分析了其组织表达特性和在核盘菌和激素诱导下的表达特性,构建了过表达载体,获得了*BnPMEI1*超表达的突变体,通过离体叶片接种鉴定证明了

其可以抑制核盘菌早期的侵染,提高油菜菌核病抗性,进一步证实了果胶酶抑制剂可提高植物对病害的防御能力。

水杨酸(SA)与茉莉酸(JA)、乙烯(ET)在植物的生长发育和逆境防御中均具有重要作用,其介导的信号通路在各种寄主-病原菌的相互作用也被广泛研究。研究表明,SA^[23]、JA^[24]和ET^[25]等信号途径参与油菜与核盘菌的互作过程。WANG等^[26]发现,油菜分别在接种后12h和接种后24h先后激活了SA和JA信号途径响应核盘菌的侵染。本研究发现,SA和MeJA均能诱导湘油15中*BnPMEI1*的上调表达,其表达量分别在SA处理后24h和MeJA处理后48h达到峰值;而SA处理对98C40中*BnPMEI1*的表达没有显著影响,MeJA处理12h后抑制了*BnPMEI1*的表达。ACC处理2个品种后*BnPMEI1*的表达量均下降。说明*BnPMEI1*是SA和JA的响应因子,受SA和JA的调控并参与相关的信号途径,但是对SA的响应程度更高。高抗和高感菌核病油菜品种可能是由于对SA与JA的敏感程度不一样,从而导致其抗病性存在差异。

*NPR1*是植物系统获得性抗性(SAR)途径中的关键调控因子,接受和转导SA介导的信号,调控下游相关防御基因的表达^[27-28]。有研究表明,*NPR1*过量表达能使芥菜对真菌类病原菌产生广谱抗性^[29],并能增强油菜对菌核病的抗性^[30]。本研究结果表明,超表达*BnPMEI1*的变异株中*BnNPR1*表达量显著高于野生型Westar($P<0.01$)。说明*BnNPR1*介导了SA信号转导途径的启动。

脂氧合酶(Lipoxygenases, LOXs)是茉莉酸合成途径的关键酶,其以亚麻酸为底物,催化茉莉酸和茉莉酸类化合物的合成^[31]。本研究中,变异株中*BnLox2*的表达量极显著提高($P<0.001$),而受到茉莉酸调控的*PDF1.2*和*BnCHB4*^[32]的表达没有显著变化,说明*BnPMEI1*基因可能是茉莉酸信号途径上游的关键基因,主要诱导JA的合成,而JA信号途径下游抗性基因的转录还需要其他相关基因的结合和启动。

对本试验结果进行分析,推测*BnPMEI1*是植物SA和JA途径的响应因子,在核盘菌的胁迫下,可诱导油菜启动SA和JA信号途径转导,产

生防御反应, 在油菜与核盘菌早期互作过程中, 抑制核盘菌的侵染, 但其具体的作用机制还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 李慧, 文李, 刘凯, 等. 油菜抗菌核病机制研究进展[J]. 作物研究, 2015, 29(1): 84–90.
- [2] 李方球, 官春云. 油菜菌核病抗性鉴定、抗性机理及抗性遗传育种研究进展[J]. 作物研究, 2001, 15(3): 85–92.
- [3] 鲍玲莉. 甘蓝型油菜 *BnaMPK6* 抗菌核病功能研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2018.
- [4] DONG X B, JI R Q, GUO X L, et al. Expressing a gene encoding wheat oxalate oxidase enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape(*Brassica napus*)[J]. *Planta*, 2008, 228(2): 331–340.
- [5] CUNHA W G, TINOCO M L P, PANCOTI H L, et al. High resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in transgenic soybean plants transformed to express an oxalate decarboxylase gene[J]. *Plant Pathology*, 2010, 59(4): 654–660.
- [6] GRISON R, GREZES-BESSET B, SCHNEIDER M, et al. Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene[J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14(5): 643–646.
- [7] LAN H Y, WANG C H, ZHANG L H, et al. Studies on transgenic oilseed rape(*Brassica napus*) plants transformed with beta-1, 3-glucanase and chitinase genes and its resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2000, 16(2): 142–146.
- [8] MONDAL K K, BHATTACHARYA R C, KOUNDAL K R, et al. Transgenic Indian mustard(*Brassica juncea*) expressing tomato glucanase leads to arrested growth of *Alternaria brassicae*[J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(2): 247–252.
- [9] WANG Z, FANG H D, CHEN Y, et al. Overexpression of *BnWRKY33* in oilseed rape enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2014, 15(7): 677–689.
- [10] WANG Z, MAO H, DONG C H, et al. Overexpression of *Brassica napus* MPK₄ enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, 22(3): 235–244.
- [11] 王淑文, 陆俊杏, 万华方, 等. *BnMAPK1* 超量表达提高甘蓝型油菜菌核病抗性[J]. 作物学报, 2014, 40(4): 745–750.
- [12] JUN W, TAO W L, BIN L Z, et al. A plant defensin gene from *Orychophragmus violaceus* can improve *Brassica napus* resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8(22): 6101–6109.
- [13] HENNIN C, HÖFTE M, DIEDERICHSEN E. Functional expression of *Cf9* and *Avr9* genes in *Brassica napus* induces enhanced resistance to *Leptosphaeria maculans*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(9): 1075–1085.
- [14] WANG Y P, FRISTENSKY B. Transgenic canola lines expressing pea defense gene *DRR206* have resistance to aggressive blackleg isolates and to *Rhizoctonia solani*[J]. *Molecular Breeding*, 2001, 8(3): 263–271.
- [15] GIOVANE A, SERVILLO L, BALESTRIERI C, et al. Pectin methylesterase inhibitor[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1696(2): 245–252.
- [16] LIONETTI V. PECTOPLATE: the simultaneous phenotyping of pectin methylesterases, pectinases, and oligogalacturonides in plants during biotic stresses[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 331.
- [17] WAKABAYASHI K, HOSON T, HUBER D J. Methyl de-esterification as a major factor regulating the extent of pectin depolymerization during fruit ripening: a comparison of the action of avocado(*Persea americana*) and tomato(*Lycopersicon esculentum*) polygalacturonases[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2003, 160(6): 667–673.
- [18] SÉNÉCHAL F, MARECK A, MARCELO P, et al. *Arabidopsis* PME17 activity can be controlled by pectin methylesterase inhibitor4[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2015, 10(2): e983351.
- [19] AN S H, SOHN K H, CHOI H W, et al. Pepper pectin methylesterase inhibitor protein CaPMEI1 is required for antifungal activity, basal disease resistance and abiotic stress tolerance[J]. *Planta*, 2008, 228(1): 61–78.
- [20] LIONETTI V, RAIOLA A, CAMARDELLA L, et al. Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*[J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(4): 1871–1880.
- [21] ZHANG L, LIU J L, CHENG J R, et al. *lncRNA7* and *lncRNA2* modulate cell wall defense genes to regulate cotton resistance to *Verticillium wilt*[J]. *Plant Physiology*, 2022, 189(1): 264–284.
- [22] LIONETTI V, RAIOLA A, CERVONE F, et al. Transgenic expression of pectin methylesterase inhibitors limits tobamovirus spread in tobacco and *Arabidopsis*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2014, 15(3): 265–274.
- [23] WANG Z, WEI F, LIU S Y, et al. Electrocatalytic oxidation of phytohormone salicylic acid at copper nanoparticles-modified gold electrode and its detection in oilseed rape infected with fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *Talanta*, 2010, 80(3): 1277–1281.
- [24] WEI F, CHENG J H, LIU S Y, et al. A robust

- sampling approach for identification and quantification of methyl jasmonate in leaf tissue of oilseed rape for analysis of early signaling in *Sclerotinia sclerotiorum* resistance[J]. *Phytochemical Analysis*, 2010, 21(3): 290–297.
- [25] ZHAO J W, BUCHWALDT L, RIMMER S R, et al. Patterns of differential gene expression in *Brassica napus* cultivars infected with *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2009, 10(5): 635–649.
- [26] WANG Z, TAN X L, ZHANG Z Y, et al. Defense to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape is associated with the sequential activations of salicylic acid signaling and jasmonic acid signaling[J]. *Plant Science*, 2012, 184: 75–82.
- [27] 汪尚, 徐鹭芹, 张亚仙, 等. 水杨酸介导植物抗病的研究进展[J]. *植物生理学报*, 2016, 52(5): 581–590.
- [28] 杜巧丽, 方远鹏, 蒋君梅, 等. 高粱病程相关基因非表达子 1(NPR1)基因家族鉴定及胁迫应答分析[J]. *核农学报*, 2021, 35(5): 1074–1083.
- [29] ALI S, MIR Z A, TYAGI A, et al. Overexpression of *NPR1* in *Brassica juncea* confers broad spectrum resistance to fungal pathogens[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1693.
- [30] WANG Z, ZHANG W H, MA L Y, et al. Overexpression of *Brassica napus NPR1* enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2020, 110: 101460.
- [31] 沙伟, 任巍巍, 马天意. 脂氧合酶基因在植物中的研究进展[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(24): 8102–8107.
- [32] 王政, 姚银安, 张志燕, 等. 甘蓝型油菜几丁质酶基因 *BnCHB4* 环境信号响应分析[J]. *生物学杂志*, 2012, 29(6): 32–34.

责任编辑: 毛友纯

英文编辑: 柳正

(上接第 24 页)

- [12] 吴宪, 张婷, 王蕊, 等. 化肥减量配施有机肥和秸秆对华北潮土团聚体分布及稳定性的影响[J]. *生态环境学报*, 2020, 29(5): 933–941.
- [13] 李根原. 不同土壤类型对广南县烤烟理化性状及感官评吸的影响[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014.
- [14] 王瑞新. 烟草化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [15] 王晓宾, 王军, 刘兰, 等. 广东烟区烤烟主要化学成分可用性评价[J]. *中国烟草科学*, 2019, 40(2): 64–72.
- [16] 王育军, 周冀衡, 张一扬, 等. 海拔对烤烟品种 NC102 和 NC297 物理特性和化学成分的影响[J]. *中国烟草科学*, 2015, 36(1): 42–47.
- [17] 罗晓虹, 王子芳, 陆畅, 等. 土地利用方式对土壤团聚体稳定性和有机碳含量的影响[J]. *环境科学*, 2019, 40(8): 3816–3823.
- [18] 惠超, 杨卫君, 宋世龙, 等. 生物炭施用对麦田土壤团聚体机械稳定性及春小麦产量的影响[J]. *土壤通报*, 2022, 53(2): 349–355.
- [19] 贾倩, 廖世鹏, 卜容燕, 等. 不同轮作模式下氮肥用量对土壤有机氮组分的影响[J]. *土壤学报*, 2017, 54(6): 1547–1558.
- [20] 陈丹梅, 段玉琪, 杨宇虹, 等. 轮作模式对植烟土壤酶活性及真菌群落的影响[J]. *生态学报*, 2016, 36(8): 2373–2381.
- [21] 夏梓泰, 程伟威, 李永梅, 等. 轮作休耕模式对土壤团聚体及有机碳含量的影响[J]. *水土保持研究*, 2022, 29(3): 31–37.
- [22] 邹嘉成, 牛莹新, 宋付朋, 等. 钾肥强化植物间作修复镉锌污染土壤效应研究[J]. *农业环境科学学报*, 2022, 41(2): 304–312.
- [23] 李建勇, 刘良教, 王翠, 等. 烤烟叶片宽长比相关因素研究[J]. *安徽农业科学*, 2016, 44(32): 34–36.
- [24] 张艳. 烤烟连作、烤烟-玉米轮作对烟叶品质和土壤养分的影响[J]. *河南农业科学*, 2014, 43(8): 45–48.
- [25] 蒋龙刚, 黄明, 宋庆赞, 等. 基于土壤有机质含量推荐的旱地冬小麦施氮量研究[J]. *中国农业科学*, 2020, 53(10): 2020–2033.
- [26] 王东旭, 贾志红, 周文辉, 等. 氯离子在不同质地植烟土壤中的迁移及烟株中的积累[J]. *中国烟草学报*, 2022, 28(1): 68–77.
- [27] TIAN X Q, LI Z, WANG L C, et al. Effects of biochar combined with nitrogen fertilizer reduction on rapeseed yield and soil aggregate stability in upland of purple soils[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2019, 17(1): 279.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维