



植物遗传资源学报

Journal of Plant Genetic Resources

ISSN 1672-1810, CN 11-4996/S

## 《植物遗传资源学报》网络首发论文

题目：普通菜豆 FWR1 基因克隆及功能验证  
作者：赵莉莉，常玉洁，王绪敏，曲江勇，武晶  
DOI：10.13430/j.cnki.jpgr.20241011002  
收稿日期：2024-10-11  
网络首发日期：2025-01-09  
引用格式：赵莉莉，常玉洁，王绪敏，曲江勇，武晶. 普通菜豆 FWR1 基因克隆及功能验证[J/OL]. 植物遗传资源学报. <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20241011002>



**网络首发：**在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认：**纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

# 普通菜豆 *FWR1* 基因克隆及功能验证

赵莉莉<sup>1,2</sup>, 常玉洁<sup>2</sup>, 王绪敏<sup>1</sup>, 曲江勇<sup>1</sup>, 武晶<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>烟台大学生命科学学院, 烟台 264005; <sup>2</sup>中国农业科学院作物科学研究所/农业农村部粮食作物基因资源评价利用重点实验室, 北京 100081)

**摘要:** 目前普通菜豆中克隆到的枯萎病抗性基因还较少, 因此, 从种质资源中鉴定挖掘枯萎病抗性基因对于普通菜豆的分子育种具有重要的意义。课题组前期通过全基因组关联分析定位到 *PvFWR1* (Fusarium Wilt Resistance 1), 并且通过单倍型分析推断其可能与普通菜豆枯萎病抗性相关, 在此基础上本研究对其进行深入研究。首先, 在抗病材料土褐腰子豆、感病材料龙芸豆 3 号中克隆 *PvFWR1* 基因序列, 经序列比对分析发现 *PvFWR1* 是一个无内含子基因, CDS 全长 1104 bp, 编码 367 个氨基酸, 属于 LRR-RLKs 家族蛋白; 然后, RT-qPCR 发现 *PvFWR1* 在抗性材料根组织中表达量为感病材料的 2.1 倍, 且在接种枯萎病病原菌后, 根组织中表达量明显上升; 最后, 利用 VIGS 技术在抗病材料对 *PvFWR1* 沉默, 接种病原菌后, 植株抗性减弱; 同时, 基于普通菜豆毛状根转化法在感病材料中对 *PvFWR1* 过表达, 接种病原菌后, 过表达植株抗性显著增强, 综合以上分析, 认为 *PvFWR1* 基因是枯萎病抗性基因。研究结果为普通菜豆枯萎病抗性机制解析及该基因的育种利用奠定了基础。

**关键词:** 普通菜豆; 镰孢菌枯萎病; *PvFWR1*; LRR-RLKs 家族

## Cloning and Functional Validation of *FWR1* Gene in Common Bean

Zhao Lili<sup>1,2</sup>, Chang Yujie<sup>2</sup>, Wang Xumin<sup>1</sup>, Qu Jiangyong<sup>1</sup>, Wu Jing<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Science, Yantai University, Yantai 264005; <sup>2</sup>Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Grain

Crop Genetic Resources Evaluation and Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100081)

**Abstract** Currently, there are still relatively few genes for resistance to wilt disease found in common bean cultivars, so identifying and mining resistance genes from germplasm resources is of great significance for molecular breeding of common bean. In the previous study, our research group identified *PvFWR1* (Fusarium Wilt Resistance 1), through a genome-wide association study and inferred that it might be related to resistance to common bean wilt through haplotype analysis. In this study, we conducted further research on *PvFWR1*. First, we cloned the *PvFWR1* gene sequence from resistant material Tuheyaozidou and the

收稿日期: 2024-10-11

第一作者研究方向为生物化学与分子生物学, E-mail: fighting211@163.com

通信作者: 武晶, 研究方向为作物种质资源鉴定、评价与利用, E-mail: wujing@caas.cn

曲江勇, 研究方向为基因组适应与进化研究、物种分类学, 系统学, 进化与生物地理学研究等, E-mail: qjy@ytu.edu.cn

**基金项目:** 国家食用豆产业技术体系(CARS-08)

**Foundation project:** China Agriculture Research System of MOF and MARA- Food Legumes (CARS-08)

susceptible material Longyundou No.3, and found that *PvFWR1* is an intronless gene with a CDS length of 1104 bp and 367 amino acids, belonging to the LRR-RLKs protein family. Then, RT-qPCR showed that the expression level of *PvFWR1* in the root tissue of resistant material was 2.1 times that of the susceptible material, and the expression level in the root tissue of the infected plants was significantly higher after inoculation with the pathogen. Finally, we used VIGS technology to silence *PvFWR1* in the resistant material, and the resistance of the plants was weakened after inoculation with the pathogen. At the same time, we used the common bean hairy root transformation method to overexpress *PvFWR1* in the susceptible material, and the resistance of the overexpression plants was significantly increased after inoculation with the pathogen. Based on these analyses, we concluded that *PvFWR1* is a resistance gene against Fusarium wilt. The research results lay a foundation for elucidating the resistance mechanism of common bean wilt and the genetic breeding and utilization of *PvFWR1*.

**Key words:** common bean; Fusarium wilt; *PvFWR1*; LRR-RLKs family

普通菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)是全球种植范围最广、栽培面积最大及食用人群最多的食用豆类,也是我国重要的出口创汇作物之一<sup>[1]</sup>,然而病害严重影响其产量和质量。近年来,镰孢菌枯萎病已经成为普通菜豆生产中危害最为严重的病害之一<sup>[2]</sup>。镰孢菌枯萎病是由尖镰孢菌菜豆专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*, Fop)引起的土传真菌性病害,在我国山西、黑龙江、贵州等种植区均有发生<sup>[3-5]</sup>。当病害发生时,一般病株率在 30~50%之间,个别重病田病株率可高达 90%以上<sup>[6-7]</sup>。因此,发掘并利用普通菜豆优异抗病基因,对于防治普通菜豆产区枯萎病具有重要的意义。

富亮氨酸重复类受体激酶(leucine-rich repeat receptor-like kinases, LRR-RLKs)是植物中最大的一类跨膜类受体激酶,其结构主要由胞外 LRR 结构域(LRR domain)、单次跨膜区(transmembrane domain, TM)和胞内激酶域(kinase domain)三部分组成<sup>[8]</sup>。该类蛋白大多数 LRR 单元的长度为 20-30 个氨基酸,数量和排列各不相同,这种多样性使 LRR-RLKs 家族成员能够感知各种配体,导致其功能的多样性<sup>[9]</sup>。研究发现, LRR-RLKs 家族在植物抗病方面发挥重要作用<sup>[10]</sup>,在拟南芥中,鞭毛蛋白识别受体 FLS2、FLS3 等作为模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)<sup>[11-12]</sup>,通过对 flg22 及 flgII-28 等多肽的识别<sup>[13-15]</sup>,引发 PTI(pattern-triggered immunity)免疫反应<sup>[16-17]</sup>;在水稻中, *XA21* 基因编码的蛋白质能特异性地识别白叶枯菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)分泌的一种效应子蛋白 AvrXa21,当 AvrXa21 与 *XA21* 结合时,会触发一系列信号转导事件,最终导致水稻启动防御反应,诱导防御相关基因表达,从而提高水稻对白叶枯病的抗性<sup>[18]</sup>;在番茄中,植物磺胺素(phytosulfokine, PSK)的主效受体 PSKR1 可以增加细胞质中  $Ca^{2+}$ 信号并激活抗病进程,从而增强番茄植株对灰葡萄孢菌的免疫力<sup>[19]</sup>;在小麦中, *TaXa21* 基因沉默后会削弱小麦对条锈菌(*Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici*)的抗性,表明 *TaXa21* 是小麦条锈病的正向调控因子<sup>[20]</sup>。因此, LRR-RLKs 对于诱导植物免疫至关重要<sup>[21-23]</sup>。本课题组前期利用全基因组关联分析定位到了 9 个普通菜豆枯萎病抗性候选基因,其中 *Phvul.001G212100* 位于 11 号染色体上,属于 LRR-RLKs 基因家族,单倍型分析发现 H2 单倍型与抗性显著关联<sup>[24]</sup>。本研究将 *Phvul.001G212100* 命名为 *PvFWR1*(Fusarium Wilt Resistance 1),对其进行功能分析,为进一步研究该基因的枯萎病抗性机制和利用该基因进行遗传改良奠定基础。

# 1 材料与方法

## 1.1 供试菌株与材料

抗病材料土褐腰子豆、感病材料龙芸豆 3 号、本生烟草(*Nicotiana benthamiana*)均由中国农业科学院作物科学研究所提供。

载体 pCAMBIA1300-GFP、pCAMBIA3301、pBPMV-IA-R1、pBPMV-IA-V2 由本实验室保存；枯萎病菌株尖镰孢菌 *Fop*-DM01 由本实验室保存；载体 pEASY-Blunt(CB101) 和大肠杆菌 *Trans1*-T1(CD501)购于北京全式金生物技术有限公司；农杆菌 GV3101 和发根农杆菌 K599 购于北京华越洋生物科技有限公司。

## 1.2 基因克隆与生物信息学分析

利用 NCBI 网站的 Primer-BLAST 程序设计引物 PvFWR1-F/R(表 1)，进行 *PvFWR1* gDNA 和 cDNA 全长以及启动子(ATG 前 2kb)的扩增，PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

利用 SOPMA 软件进行蛋白二级结构分析，利用 Swiss-Model 软件进行蛋白三级结构建模；利用 ExPASy 软件分析 *PvFWR1* 编码蛋白质的理化性质，利用 ProtScale 预测亲疏水性，利用 TMHMM Server v.2.0 软件预测跨膜区，利用 SignalP 4.1 预测信号肽特性；利用 BLASTP 在线分析软件 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 查询豇豆、绿豆、小豆、黑吉豆、大豆等作物中 *PvFWR1* 的同源序列，并分析序列保守结构域，利用 MEGA 11.0 软件构建同源进化树。

## 1.3 实时荧光定量

利用 Applied Biosystems 7500 实时定量 PCR 仪器分析 *PvFWR1* 的相对表达量，*PvActin* 作为内参，数据分析采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法，试验设置三次生物学重复。实时荧光定量 PCR 引物 FWR1-F/R(表 1)根据 *PvFWR1* 的 cDNA 序列设计。

## 1.4 载体构建

特异性引物 SL-F/R(表 1)扩增候选基因序列(不包括终止密码子)，利用 *Hind* III 和 *Spe* I 酶切位点正向插入载体 pCAMBIA1300-GFP 中，构建 *PvFWR1* 亚细胞定位载体，命名为 pCAMBIA1300-GFP-*PvFWR1*。特异性引物 SG-F/R(表 1)扩增抗病材料土褐腰子豆中 *PvFWR1* 300 bp 的特异性片段，利用 *Bam*H I 与 *Sal* I 酶切位点将扩增片段反向插入 pBPMV-IA-V2 载体中，命名为 pBPMV-*PvFWR1*。特异性引物 OE-F/R(表 1)扩增候选基因序列，利用 *Nco* I 和 *Bst*E II 酶切位点正向插入载体 pCAMBIA3301 中，构建 *PvFWR1* 过表达载体，命名为 pCAMBIA3301-*PvFWR1*。

## 1.5 亚细胞定位

利用 PSORT(<http://psort.hgc.jp/>)预测 *PvFWR1* 亚细胞定位结果。将重组质粒 pCAMBIA1300-GFP-*PvFWR1* 以及 pCAMBIA1300-GFP 转化农杆菌 GV3101, 通过烟草注射法将转化后的 GV3101 导入到 6-8 周大小的烟草表皮细胞中, 黑暗培养 1 d, 光照培养 1 d, 使用激光共聚焦显微镜观察 GFP 信号。

## 1.6 BPMV 介导的基因沉默

BPMV 介导的基因沉默技术体系方法参照 Zhang 等<sup>[25]</sup>的方法, 略有改动。将 pBPMV-*PvFWR1* 和 pBPMV-IA-V2 分别与病毒质粒载体 BPMV-IA-R1 混合, 利用下胚轴双孔注射法, 将病毒载体接种于抗病材料土褐腰子豆, 用 1mL 注射器在菜豆植株下胚轴茎基上方 0.5 cm 处和 1.5 cm 处各扎一个小孔, 下方为注射孔, 上方为观察孔, 从注射孔将上述混合质粒注入, 待观察孔轻微有菌液溢出时则为接种成功。使用未接种病毒的土褐腰子豆植株作为对照组 CK, 接种 pBPMV-IA-V2 病毒的植株作为对照组 MOCK, 龙芸豆 3 号作为感病对照。

## 1.7 菜豆毛状根转化

将载体 pCAMBIA3301-*PvFWR1* 以及 pCAMBIA3301 转化发根农杆菌 K599 菌株感受态细胞, 接种普通菜豆 4 日龄幼苗, 接种后保持高湿环境, 暗培养 1 d, 正常培养 7 d, 待毛状根露头后, 剪掉初生根, 移栽至蛭石中使毛状根继续生长 14 d。使用仅接种 K599 菌株的龙芸豆 3 号植株作为对照组 CK, 接种 pCAMBIA3301 载体的植株作为对照组 MOCK, 仅接种 K599 菌株的土褐腰子豆作为抗病对照。

## 1.8 抗病性鉴定

利用下胚轴双孔注射法<sup>[24]</sup>对基因沉默植株接种枯萎病病原菌, 接种 7 d 后调查植株发病情况; 利用玉米粉接种体法<sup>[26]</sup>对过表达植株接种枯萎病病原菌, 接种 14 d 后调查植株发病情况。

## 1.9 定量测定

提取抗病材料土褐腰子豆叶片、感病材料龙芸豆 3 号叶片以及普通菜豆枯萎病病原菌 DNA, 测定 DNA 浓度, 分别使用灭菌水、土褐腰子豆叶片 DNA 以及龙芸豆 3 号叶片 DNA 作为溶液背景, 将病原菌 DNA 溶液稀释成 6 个浓度梯度, 分别为 100、10、1、 $1 \times 10^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-2}$ 、 $1 \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ L, 利用 RT-qPCR 的特异性引物 *Fop-F/R*(表 1)进行扩增; 以  $C_T$  值作为纵坐标, DNA 样品浓度的对数值作为横坐标绘制标准曲线并计算回归方程。采集接种枯萎病病原菌 14 d 后的基因过表达植株叶片以及接种枯萎病病原菌 7 d 后的基因沉默植株叶片并提取 DNA, 调整 DNA 浓度为 50 ng/ $\mu$ L, 利用 RT-qPCR 结果, 根据已得到的回归方程计算病原菌含量(图 1)。

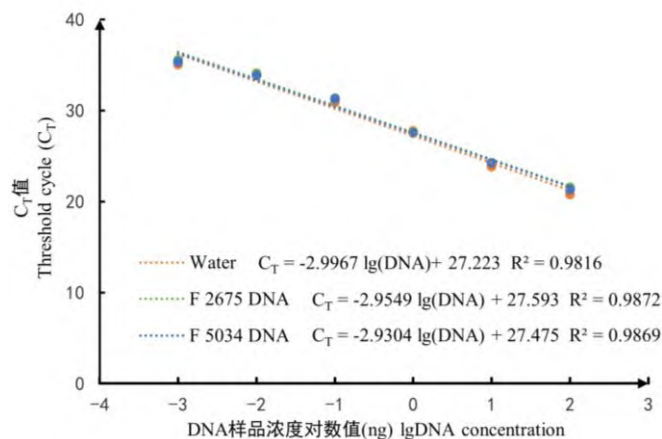


图 1 *Fop* DNA 标准曲线

Fig. 1 *Fop* DNA standard curve

表 1 本试验所用引物

Table 1 Primers used in this research

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	酶切位点 Restriction enzyme cutting site	引物用途 Primer usage
PvFWR1-F	TGCATTGCACTATTCCACGC	-	gDNA/cDNA 扩增
PvFWR1-R	ACCGACAACCCAACACTCAT	-	
Actin-F	GAAGTTCCTCTCCAACCATCC	-	RT-qPCR 内参
Actin-R	TTTCCTTGCTCATTCTGTCCG	-	
FWR1-F	GCCGACTGGAAGGCGATCTC	-	RT-qPCR
FWR1-R	TCGGCGAGACTCACTACT	-	
SL-F	ATCGACTCTAGAAAGCTTATGGCTTCTCCTTC	<i>Hind</i> III	亚细胞定位载体构建
SL-R	GGTACCGGATCCACTAGTACAAGCCTTCAACGG	<i>Spe</i> I	
SG-F	GAATCCTCTGCATGAGGATCCGGAATCTCGCCGCGAT	<i>Bam</i> HI	基因沉默载体构建
SG-R	CTCTCGAGGCCTGGAGTCGACACATGGAACACCACTGAC	<i>Sal</i> I	
OE-F	GGACTCTTGACCATGGATGGCTTCTTCCTTC	<i>Nco</i> I	基因过表达载体构建
OE-R	ATTCGAGCTGGTCACCTCAACAAGCCTTCAA	<i>Bst</i> E II	

下划线序列代表酶切位点;-代表无酶切位点

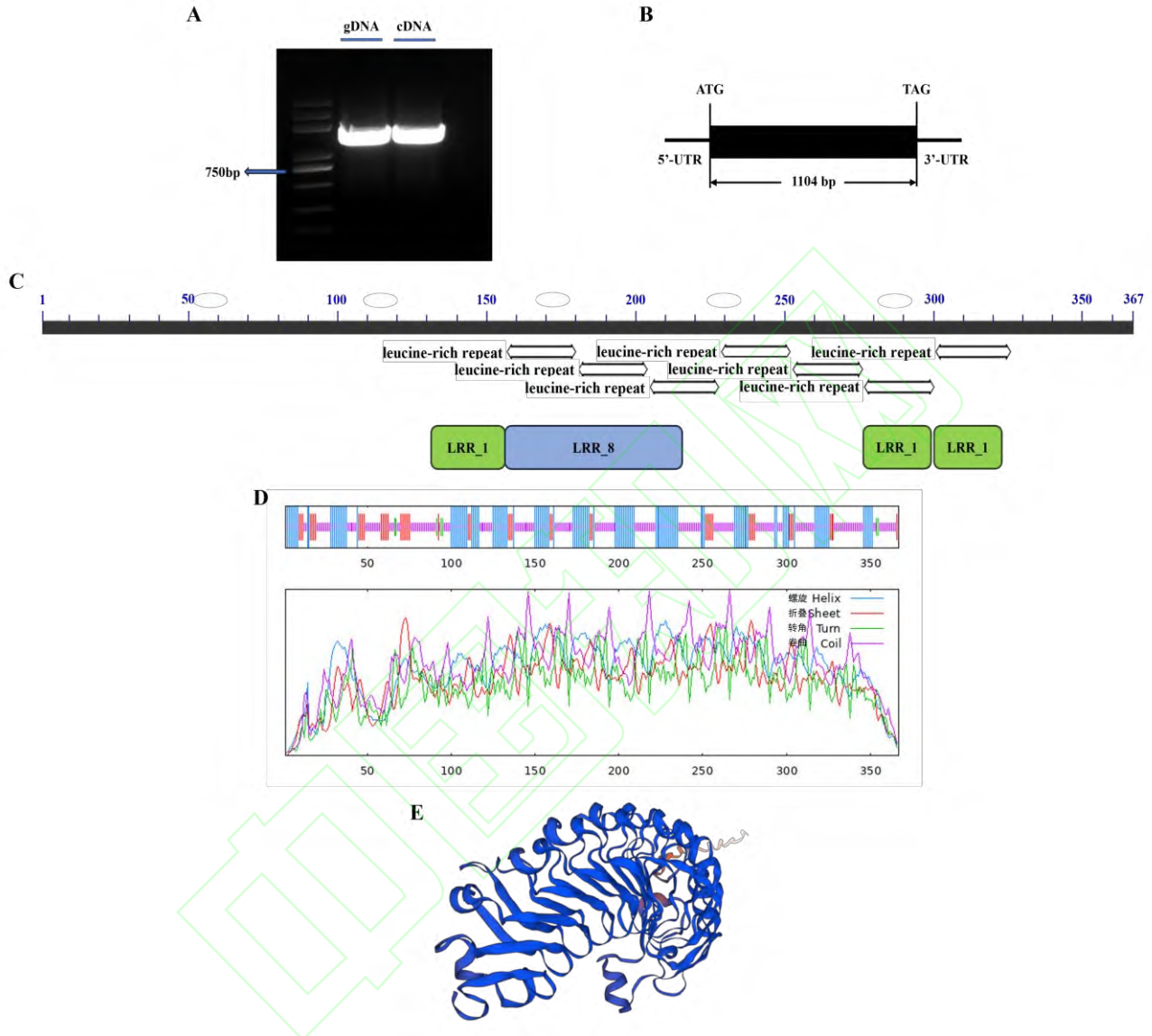
The underlined sequence represents the restriction enzyme cutting site ; - represents no restriction enzyme cutting site

## 2 结果与分析

### 2.1 普通菜豆 *PvFWR1* 基因克隆与序列分析

*PvFWR1* 基因 gDNA 以及 cDNA 序列分析发现, *PvFWR1* 基因 gDNA 与 cDNA 全长均为 1104 bp, 说明该基因是一个无内含子基因 (图 2-A, B)。 *PvFWR1* 基因编码 367 个氨基酸, 包含 3 个 LRR 结构域和 1 个 LRR\_8 结构域, 属于 LRR-RLKs 家族成员 (图 2-C)。 蛋白二级结构分析表明, 该蛋白包含 128 个  $\alpha$ -螺旋, 占 34.9%; 48 个延伸链, 占 13.1%; 7 个  $\beta$ -折叠, 占 1.9%; 及 184 个无规则卷曲, 占 50.1% (图 2-D), 说明  $\alpha$ -螺旋与无规则卷曲是二级结构的主要原件/构象, 延伸链与  $\beta$ -折叠散布于基因编码的整条肽链中, 无其他二级结构。 利用 Swiss-Model 软件, 预测 *PvFWR1* 蛋白三级结构, 大部分区域可信度在 70% 以上(图 2-E)。

PvFWR1 蛋白预测分子质量为 39.14 KDa，理论  $pI$  为 6.51，最疏水性数值是 2.889，最亲水数值则为 1.994，并且在 PvFWR1 蛋白中亲水性氨基酸数量更多，是偏亲水性蛋白质(图 3-A)。对 PvFWR1 跨膜区以及信号肽进行分析，发现其编码氨基酸序列具有跨膜结构域，并且第 1 至 20 个氨基酸处具有信号肽特性，属于外分泌蛋白(图 3-B, C)。

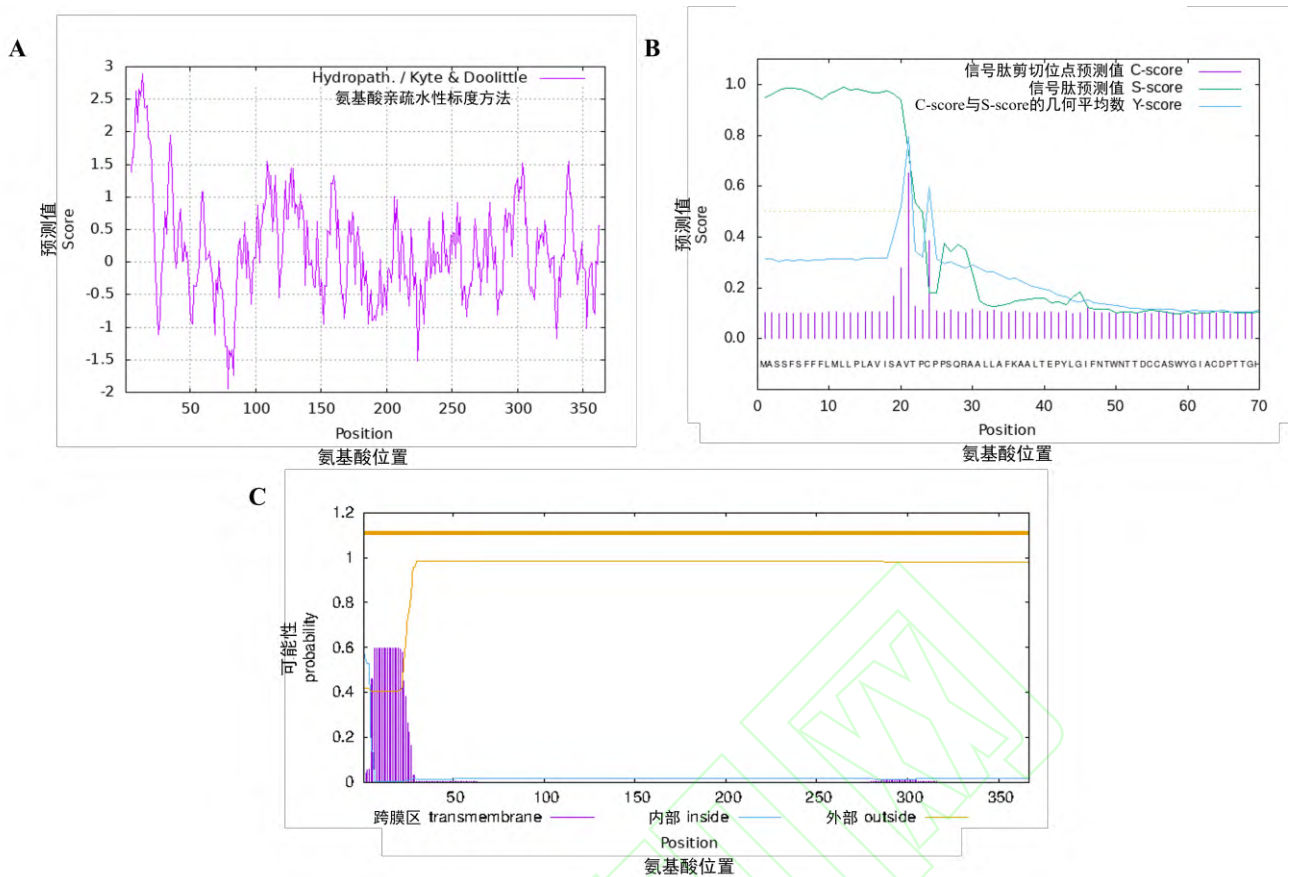


A: *PvFWR1* 基因 PCR 扩增产物; B: *PvFWR1* 基因结构; C: *PvFWR1* 蛋白结构域分析, 标尺代表氨基酸位置; D: *PvFWR1* 蛋白二级结构, 标尺代表氨基酸位置; E: *PvFWR1* 蛋白三级结构, 蓝色区域表示可信度大于 70%, 橙色区域表示可信度为 60% - 70%, 红色区域表示可信度小于 50%

A: PCR amplification product of *PvFWR1* gene; B: Structure of *PvFWR1* gene; C: Analysis of protein domains of *PvFWR1*, the bar represents the amino acid position; D: Secondary structure of *PvFWR1* protein, the bar represents the amino acid position; E: Tertiary structure of *PvFWR1* protein, blue regions indicate a confidence level of greater than 70%, orange regions indicate a confidence level of 60% - 70%, red regions indicate a confidence level of less than 50%

图 2 *PvFWR1* 基因克隆及蛋白结构预测

Fig. 2 Cloning and protein structure prediction of *PvFWR1* gene



A: PvFWR1 蛋白亲疏水性分析; B: PvFWR1 蛋白信号肽分析; C: PvFWR1 蛋白跨膜区分析

A: Analysis of hydrophilicity of PvFWR1 protein; B: Analysis of signal peptide of PvFWR1 protein; C: Analysis of transmembrane region of PvFWR1 protein

图 3 PvFWR1 蛋白功能预测

Fig. 3 Prediction of PvFWR1 protein function

## 2.2 *PvFWR1* 基因序列多样性分析

*PvFWR1* 基因在普通菜豆抗感材料间的序列比对分析说明, 抗感材料间 cDNA 序列存在 12 个碱基差异, 其中 4 个为非同义突变, 导致 4 个氨基酸的差异(图 4-A, B)。使用 DNAMAN 软件分析 *PvFWR1* 基因启动子序列(ATG 上游 2kb), 发现抗感材料间序列差异较大(图 4-C), 因此, 推测抗感材料间启动子序列差异的存在可能会影响 *PvFWR1* 基因的表达。同时, 将 *PvFWR1* 所编码的氨基酸序列与豇豆、绿豆、小豆、黑吉豆、大豆等豆科作物同源基因的氨基酸序列比对分析, 发现 *PvFWR1* 与豇豆亲缘关系最为相近, 氨基酸序列相似性达到 90.91% (图 5)。





图 4 *PvFWR1* 基因在抗感材料间的差异

Fig. 4 Differences in *PvFWR1* gene between resistant and susceptible materials

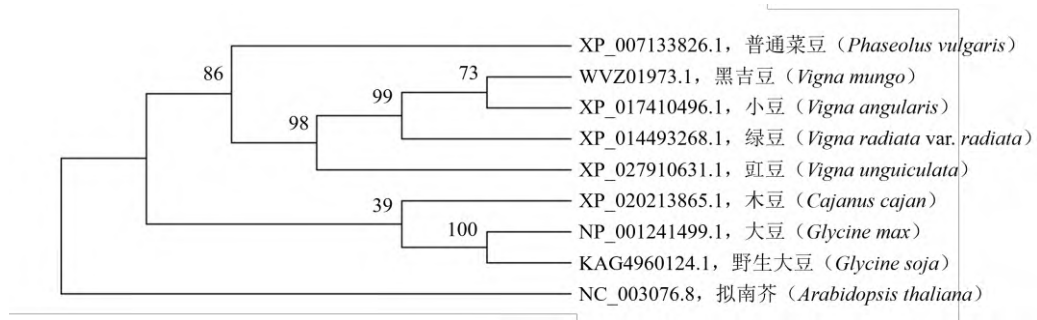
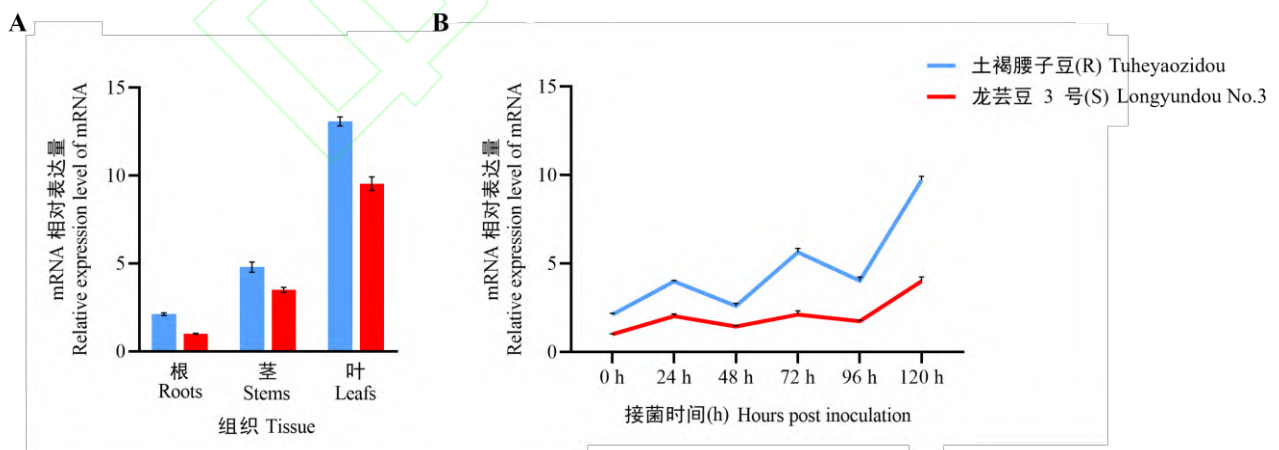


图 5 *PvFWR1* 蛋白亲缘关系进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of *PvFWR1* protein

### 2.3 普通菜豆 *PvFWR1* 基因表达模式

采用 RT-qPCR 技术分析 *PvFWR1* 基因在抗病材料土褐腰子豆以及感病材料龙芸豆 3 号根、茎、叶等组织中的相对表达量。结果表明，*PvFWR1* 基因在抗感材料各个组织中均表达，在叶中的表达丰度最高，茎中次之，在根中表达丰度最低；同时，*PvFWR1* 基因在抗病材料各组织中的表达量高于在感病材料中的表达量，根中表达量是感病材料的 2.1 倍，在茎中以及叶中表达量是感病材料的 1.4 倍(图 6-A)。接种病原菌 *Fop*-DM01 菌株后，*PvFWR1* 基因在抗病材料中的表达量明显高于接种前，在接种病原菌后的 72 h 和 120 h 达到最高，分别为接种前表达水平的 2.7 和 4.6 倍，表明 *PvFWR1* 基因响应枯萎病病原菌的侵染(图 6-B)。



A: *PvFWR1* 基因组织特异性表达分析; B: *PvFWR1* 接菌前后相对表达量

A: Gene-specific expression analysis of *PvFWR1* in tissue; B: Relative expression of *PvFWR1* before and after inoculation

图 6 *PvFWR1* 基因表达模式析

Fig. 6 Analysis of *PvFWR1* gene expression pattern

## 2.4 亚细胞定位

为了研究 *PvFWR1* 在细胞内的表达模式，利用 PSORT(<http://psort.hgc.jp/>)预测该蛋白在细胞膜上表达。通过烟草表皮注射法使 *PvFWR1*-GFP 融合蛋白在烟草表皮细胞中瞬时表达，结果显示 *PvFWR1*-GFP 融合蛋白在细胞膜上观察到绿色荧光，GFP 蛋白在细胞核、细胞膜及细胞质中均观察到绿色荧光，表明 *PvFWR1* 在细胞膜上表达(图 7)，与预测结果一致。

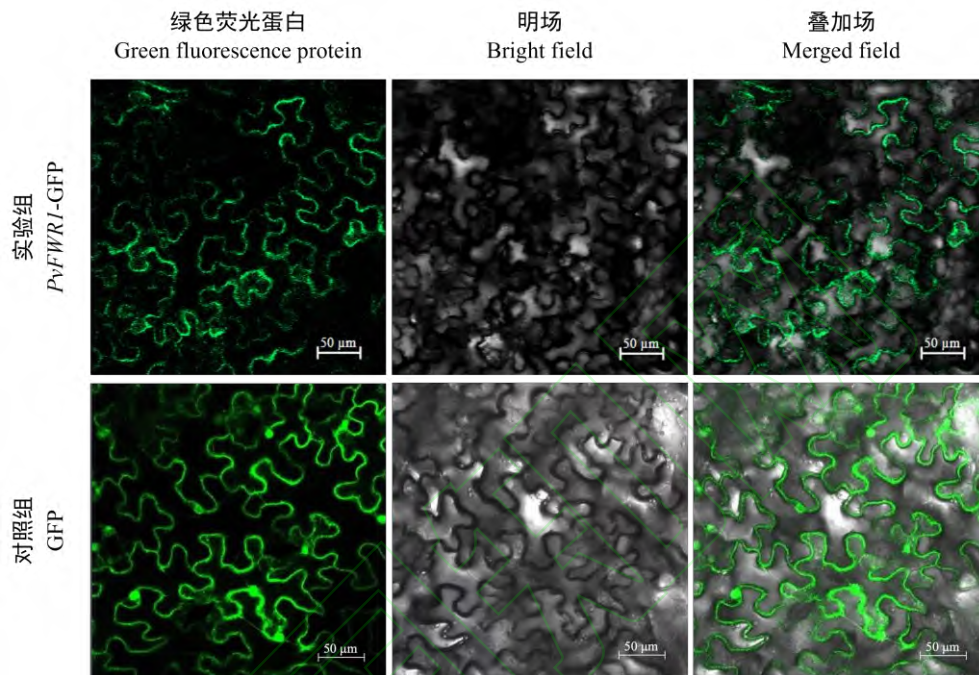


图 7 亚细胞定位分析 *PvFWR1* 融合蛋白定位

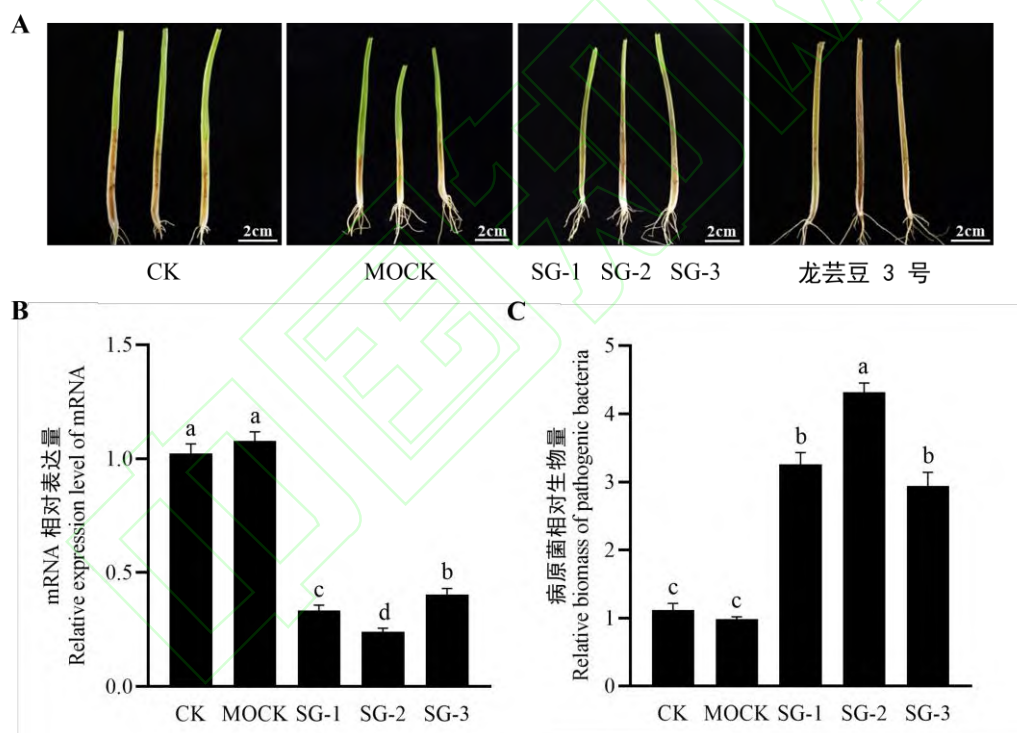
Fig. 7 Subcellular localization of *PvFWR1* fused protein

## 2.5 *PvFWR1* 基因功能验证

对土褐腰子豆幼茎接种 BPMV 病毒 14 d 后，观察到植株叶片出现病毒病的典型症状，叶片开始皱缩；进一步采用 RT-qPCR 检测第一片三出复叶的 *PvFWR1* 基因表达量，结果表明，其中 9 个单株叶片中的 *PvFWR1* 基因表达量下调，下调幅度最大为 4.3 倍，最小为 2.7 倍，说明这些单株的 *PvFWR1* 基因被不同程度沉默(图 8-B)。然后，对这些单株采用下胚轴双孔注射法接种枯萎病病原菌，7 d 后调查其发病情况。抗性调查结果表明，9 个单株的平均发病级别为 5 级，其中 7 个单株的发病级别为 5 级，另外 2 个单株的发病级别分别为 3 级和 7 级，同时，CK 和 MOCK 平均发病级别分别为 3 和 2.3 (图 8-A)，说明 *PvFWR1* 基因沉默后植株枯萎病抗性降低。进一步对植株的病原菌定殖量进行分析，结果表明，9 个基因沉默单株病原菌定殖量与两组对照相比均上调，上调幅度最大为 4.4 倍，最小为 2.9 倍，并且基因表达量下调幅度越大，植株病原菌定殖量越多(图 8-B, C)。综合分析候选基因表达量、抗性鉴定结果以及病原菌定殖量，可以看出沉默 *PvFWR1* 基因能够降低植株的枯萎病抗性。

对龙芸豆 3 号幼苗接种 K599 发根农杆菌 7 d 后，观察到植株毛状根开始露头；将长出毛状根的植株去除旧根移栽至蛭石中，14 d 后采用 RT-qPCR 检测植株毛状根的 *PvFWRI* 基因表达量，结果表明，有 11 个单株毛状根中的 *PvFWRI* 基因表达量上调，上调幅度最大为 5.8 倍，最小为 4.2 倍，说明这些单株中的 *PvFWRI* 基因被不同程度过表达(图 9-B)。然后，对这些单株采用玉米粉接种体法，接种枯萎病病原菌，14 d 后调查其发病情况。抗性调查结果表明，11 个单株的平均发病级别为 6.3 级，其中 7 个单株的发病级别为 7 级，另外 4 个单株的发病级别 5 级，同时，我们也注意到 CK 和 MOCK 平均发病级别分别为 8.6 和 9(图 9-A)，说明 *PvFWRI* 基因过表达后植株枯萎病抗性升高。进一步对植株的病原菌定殖量进行分析，结果表明，11 个基因过表达单株病原菌定殖量与两组对照相比均下调，下调幅度最大为 5.1 倍，最小为 3.4 倍，并且基因表达量上调幅度越大，植株病原菌定殖量越少(图 9-B, C)。综合分析候选基因表达量、抗性鉴定结果以及病原菌定殖量，可以看出 *PvFWRI* 基因能够使植株枯萎病抗性增强。

综合候选基因过表达和沉默试验结果，认为 *PvFWRI* 基因是枯萎病抗性基因。



A: *PvFWRI* 沉默植株接种 2 周后病情特征。CK: 野生型植株; MOCK: 空载体接种植株; SG: *PvFWRI* 沉默植株; 龙芸豆 3 号: 感病对照; B:

*PvFWRI* 相对表达量; C: *PvFWRI* 沉默植株叶片中病原菌相对生物量; 不同小写字母表示在  $P < 0.05$  水平差异显著

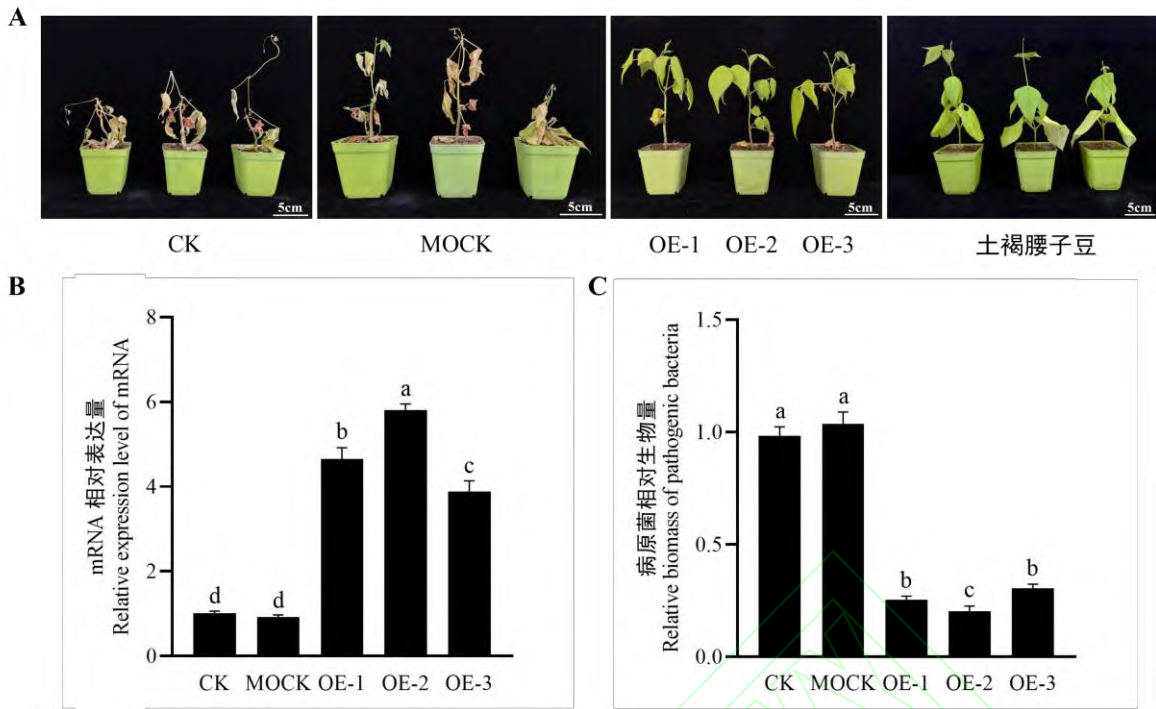
A: The disease symptoms of *PvFWRI* silenced plants 2 weeks after inoculation. CK: Wild-type plants; MOCK: Plants inoculated with empty vector; SG:

*PvFWRI* silenced plants; Longyudou No.3: Sensitive control; B: Relative expression level of *PvFWRI*; C: Relative pathogen biomass in the leaves of *PvFWRI*

silenced plants; Different lowercase letters indicate significant differences at  $P < 0.05$  level

图 8 *PvFWRI* 基因沉默对普通菜豆枯萎病抗性的影响

Fig. 8 Effect of *PvFWRI* gene silencing on resistance to fusarium wilt in common bean



A: *PvFWR1* 过表达植株接菌 2 周后病情特征。CK: 非转化植株; MOCK: 空载体转化植株; OE: *PvFWR1* 过表达植株; 土褐腰子豆: 抗病对照;  
 B: *PvFWR1* 相对表达量; C: *PvFWR1* 过表达植株叶片中病原菌相对生物量; 不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著

A: The disease symptoms of *PvFWR1* overexpression plants 2 weeks after inoculation. CK: Non-transformed plants; MOCK: Transformed plants with empty vector; OE: *PvFWR1* overexpression plants; Tuheyaozidou: Resistant control; B: Relative expression level of *PvFWR1*; C: Relative pathogen biomass in the leaves of *PvFWR1* overexpression plants; Lowercase letters indicate significant differences at a p-value of 0.05

**图 9 *PvFWR1* 基因过表达对普通菜豆枯萎病抗性的影响**

**Fig. 9 Effect of *PvFWR1* gene overexpression on resistance to fusarium wilt in common bean**

### 3 讨论

*PvFWR1* 基因无内含子, CDS 全长 1104 bp, 编码 367 个氨基酸, 属于 LRR-RLKs 家族蛋白, 在抗感材料间 CDS 序列存在 12 个碱基突变, 其中 4 个为非同义突变。据报道, LRR-RLKs 是 PTI 系统中的一个大型蛋白质家族, 其特异性的与配体结合, 进而激活胞内激酶域的自磷酸化和互磷酸化活性, 进一步启动转录和激素调控, 在宿主与病原体相互识别中起到极其重要的作用<sup>[23]</sup>。序列数据分析结果表明, *PvFWR1* 与拟南芥中的 *NIK1*、*PEPR1* 以及水稻中的 *SERK1*、*BAK1* 等基因具有同源性。*NIK1* 在对线虫等病原体的防御机制中起到重要的作用<sup>[11]</sup>; 而 *PEPR1* 则通过识别自身产生的多肽信号 *Pep 1*, 参与植物的免疫反应<sup>[27-28]</sup>。*OsSERK1* 过表达植株的水稻瘟病菌的抗性显著提高<sup>[29]</sup>; *OsBAK1* 通过与 NADPH 氧化酶 *RbohD* 直接互作促进活性氧的产生, 有助于植物抵御病原菌的侵染<sup>[30-31]</sup>。因此, 推测普通菜豆中的 *FWR1* 基因在抵御生物胁迫等方面发挥同样的作用, 通过介导多样的信号传导途径参与普通菜豆抵抗枯萎病病原菌的入侵。为了研究 *PvFWR1* 对病原菌的响应模式, 对抗感材料接种普通菜豆镰孢菌枯萎病原菌 *Fop-DM01* 菌株后 0、24、48、72、96、120 h 的基因表达量进行检测, 结果发现在接种病原菌后 *PvFWR1* 在抗病材料中的表达

量明显高于接种前，在接种病原菌后的 72 h 和 120 h，基因表达量达到最高，分别为接种前表达水平的 2.7 和 4.6 倍，也初步说明 *PvFWRI* 正向调控普通菜豆枯萎病抗性。

本研究采用 VIGS 和毛状根转化两种方法验证 *PvFWRI* 基因功能。利用 VIGS 方法将基因在抗病材料土褐腰子豆中沉默，发现在接种病原菌后，与对照相比基因沉默植株发病级别显著升高，病原菌定殖量显著增多，并且基因表达量下调幅度越大，病原菌定殖量越多；利用毛状根转化法将 *PvFWRI* 基因在感病材料龙芸豆 3 号中过表达，发现在接种枯萎病原菌后，与对照相比过表达植株发病级别显著降低，病原菌定殖量显著减少，并且基因表达量上调幅度越大，病原菌定殖量越少，基因功能验证试验表明 *PvFWRI* 基因正向调节普通菜豆对枯萎病的抗性。李园等<sup>[9]</sup>对 *PvFWRI* 基因的单倍型分析，也证实了该基因与抗病性显著关联。因此，初步认为 *PvFWRI* 基因为枯萎病抗性基因。

## 4 结论

*PvFWRI* 基因在普通菜豆各组织中均表达，且在抗病材料土褐腰子豆根中表达量为感病材料龙芸豆 3 号根中的 2.1 倍；在接种枯萎病病原菌后，土褐腰子豆 *PvFWRI* 基因表达量明显提升。基因过表达植株枯萎病发病等级和病原菌定殖量均显著降低，基因沉默植株反之。因此，*PvFWRI* 响应枯萎病病原菌侵染，并正向调控普通菜豆镰孢菌枯萎病抗性水平。

## 参考文献

- [1] Wu J, Wang L F, Fu J J, Chen J B, Wei S H, Zhang S L, Zhang J, Tang Y S, Chen M L, Zhu J F, Lei L, Geng Q H, Liu C L, Wu L, Li X M, Wang X L, Wang Q, Wang Z L, Xing S L, Zhang H K, Blair M W, Wang S M. Resequencing of 683 common bean genotypes identifies yield component trait associations across a north-south cline. *Nature Genetics*, 2020, 52 (1): 118-125
- [2] Xue R F, Wu J, Wang L F, Blair M W, Wang X M, Ge W D, Zhu Z, Wang S M. Salicylic acid enhances resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 2014, 33 (2): 470-476
- [3] 程须珍. 王述民. 普通菜豆生产技术. 北京: 北京教育出版社, 2016: 83-87  
Cheng X Z, Wang S M. Common bean production technology. Beijing: Beijing Education Press, 2016: 83-87
- [4] Liu Y, Huang Y N, Li Z, Feng M, Ge W D, Zhong C, Xue R F. Genome-wide identification of the TGA genes in common bean (*Phaseolus vulgaris*) and revealing their functions in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* infection. *Frontiers in Genetics*, 2023, 14: 1137634.
- [5] Xue R F, Wu X B, Wang Y J, Zhuang Y, Chen J, Wu J, Ge W D, Wang L F, Wang S M, Blair M W. Hairy root transgene expression analysis of a secretory peroxidase (*PvPOX1*) from common bean infected by *Fusarium* wilt. *Plant Science*, 2017, 260: 1-7
- [6] Xue R F, Wu J, Zhu Z D, Wang L F, Wang X M, Wang S M, Blair M W. Differentially expressed genes in resistant and susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *PLoS ONE*, 2015, 10 (6): e0127698.
- [7] Xue R F, Feng M, Chen J, Ge W D, Blair M W. A methyl esterase 1 (*PvMES1*) promotes the salicylic acid pathway and enhances *Fusarium* wilt resistance

in common beans. *Theoretical and Applied Genetics*, 2021, 134 (8): 2379-2398

- [8] Cao Y P, Mo W Z, Li Y L, Li W Y, Dong X, Liu M L, Jiang L, Zhang L. Deciphering the roles of leucine-rich repeat receptor-like protein kinases (LRR-RLKs) in response to *Fusarium wilt* in the *Vernicia fordii* (Tung tree). *Phytochemistry*, 2021, 185: 112686
- [9] Gish L A, Clark S E. The RLK/Pelle family of kinases. *The Plant Journal*, 2011, 66 (1): 117-127
- [10] Aigerim S, Nurbanu D, Symbat S, Margulan S, Okoth O J, Assylay K, Sudhakar S. Receptor-like kinases (LRR-RLKs) in response of plants to biotic and abiotic stresses. *Plants*, 2022, 11 (19): 2660
- [11] Li B, Ferreira M A, Huang M L, Camargos L F, Yu X, Teixeira R M, Carpinetti P A, Mendes G C, Gouveia-Mageste B C, Liu C L, Pontes C S L, Brustolini O J B, Martins L G C, Melo B P, Duarte C E M, Shan L B, He P, Fontes E P B. The receptor-like kinase NIK1 targets FLS2/BAK1 immune complex and inversely modulates antiviral and antibacterial immunity. *Nature, Communications*, 2019, 10 (1): 4996
- [12] Zhang N, Pombo M A, Rosli H G, Martin G B. Tomato wall-associated kinase SIWak1 depends on Fls2/Fls3 to promote apoplastic immune responses to *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiology*, 2020, 183 (4): 1869-1882
- [13] Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, Boller T, Felix G. The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *The Plant Cell*, 2006, 18 (2): 465-476
- [14] Sun Y, Li L, Macho A P, Han Z, Hu Z, Zipfel C, Zhou J M, Chai J. Structural basis for flg22-induced activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 immune complex. *Science*, 2013, 342 (6158): 624-628
- [15] Ciarroni S, Clarke C R, Liu H J, Eckshtain L N, Mazzaglia A, Balestra G M, Vinatzer B A. A recombinant flagellin fragment, which includes the epitopes flg22 and flgII-28, provides a useful tool to study flagellin-triggered immunity. *Journal of General Plant Pathology*, 2018, 84 (3): 169-175
- [16] Tian S N, Liu D, Zhong C L, Xu H Y, Yang S, Fang Y, Ran J, Liu J Z. Silencing GmFLS2 enhances the susceptibility of soybean to bacterial pathogen through attenuating the activation of Gm MAPK signaling pathway. *Plant Science*, 2020, 292: 110386
- [17] Fonseca J P, Lakshmanan V, Boschiero C, Mysore K S. The pattern recognition receptor FLS2 can shape the Arabidopsis rhizosphere microbiome  $\beta$ -diversity but Not EFR1 and CERK1. *Plants*, 2022, 11 (10): 1323
- [18] Yang Z X, Zhu Z, Guo Y L, Lan J P, Zhang J S, Chen S, Dou S G, Yang M, Li L Y, Liu G Z. OsMKK1 is a novel element that positively regulates the Xa21-mediated resistance response to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Plant Cell Reports*, 2024, 43 (2): 31
- [19] Zhang H, Hu Z J, Lei C, Zheng C F, Wang J, Shao S J, Shi K. A plant phytosulfokine peptide initiates auxin-dependent immunity through cytosolic  $Ca^{2+}$  signaling in tomato. *The Plant Cell*, 2018 (3): 652-667
- [20] Wang J H, Wang J J, Shang H S, Chen X M, Xu X M, Hu X P. TaXa21, a leucine-rich repeat receptor-like kinase gene associated with TaWRKY76 and TaWRKY62, plays positive roles in wheat high-temperature seedling plant resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2019, 32 (11): 1526-1535
- [21] Schlöffel M A, Salzer A, Wan W L, van Wijk R, Del Corvo R, Šemanjski M, Symeonidi E, Slaby P, Kilian J, Maček B, Munnik T, Gust A A. The BIR2/BIR3-associated phospholipase D $\gamma$ 1 negatively regulates plant immunity. *Plant Physiology*, 2020, 183 (1): 371-384
- [22] Zhou J M, Zhang Y. Plant immunity: danger perception and signaling. *Cell*, 2020, 181 (5): 978-989
- [23] Shi Y F, Bao X Y, Song X P, Liu Y Y, Li Y X, Chen X M, Hu X P. The LRR-RLK protein TaSERK1 positively regulates high-temperature seedling plant resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* through interacting with TaDJA7. *Phytopathology*, 2023, 113 (7): 1325-1334

- [24] 李园, 常玉洁, 王兰芬, 王述民, 武晶. 普通菜豆镰孢菌枯萎病抗性种质资源筛选及全基因组关联分析. 植物学报, 2023, 58 (1): 51-61.
- Li Y, Chang Y J, Wang L F, Wang S M, Wu J. Screening of germplasm resources resistant to fusarium wilt in common bean and genome-wide association analysis. Chinese Bulletin of Botany, 2023, 58 (1): 51-61
- [25] Zhang C Q, Bradshaw J D, Whitham S A, Hill J H. The development of an efficient multipurpose bean pod mottle virus viral vector set for foreign gene expression and RNA silencing. Plant Physiology, 2010, 153 (1): 52-65
- [26] 薛仁凤. 普通菜豆镰孢菌枯萎病抗病种质鉴定及抗病机理研究. 北京: 中国农业科学院, 2012
- Xue R F. Identification of germplasm resistance and disease resistance mechanism of fusarium wilt in common bean. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012
- [27] 魏志蓉. 番茄(亨氏 1706)富含亮氨酸重复序列受体蛋白激酶基因家族生物信息学与表达分析. 天津: 天津大学, 2016
- Wei Z R. Bioinformatics and expression analysis of tomato (Heinz 1706) rich leucine repeat receptor protein kinase gene family. Tianjin: Tianjin University, 2016
- [28] Yamaguchi Y, Huffaker A, Bryan A C, Tax F E, Ryan C A. PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in Arabidopsis. The Plant Cell, 2010, 22 (2): 508-522
- [29] Zuo S M, Zhou X G, Chen M S, Zhang S L, Schwessinger B, Ruan D L, Yuan C, Wang J, Chen X W, Ronald P C. OsSERK1 regulates rice development but not immunity to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* or *Magnaporthe oryzae*. Journal of Integrative Plant Biology, 2014, 56 (12): 1179-1192
- [30] Liao H L, Xiao X R, Li X Q, Chen Y, Fu X M, Lin D Z, Niu X L, Chen Y H, He C D. OsBAK1 is involved in rice resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99. Plant Biotechnology Reports, 2016, 10 (2): 75-82
- [31] Cui B M, Pan Q N, Cui W Q, Wang Y Q, Loake V I P, Yuan S G, Liu F Q, Loake G J. S-nitrosylation of a receptor-like cytoplasmic kinase regulates plant immunity. Science Advances, 2024, 10 (11): eadk3126