

玉米 COBRA 基因家族分析及重要成员 *ZmCOBL03* 基因编辑

郝竞杰^{1,2}, 赵方方³, 陈子奇², 尹悦佳², 郭嘉², 张闯²,
于志佳^{1,2}, 孙佳琪², 吴委林¹, 刘相国^{1,2}

(1. 延边大学农学院, 吉林 延吉 133002; 2. 吉林省农业科学院农业生物技术研究所, 长春 130033;
3. 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150025)

摘要: 利用生物信息学的方法分析玉米 COBRA 家族 10 个成员的序列特征、与其他物种的进化关系和组织特异性表达模式。结果表明, 10 个 COBRA 家族基因都含有 CCVS 保守结构域, 并且均定位于细胞膜上。系统进化分析结果显示, 该家族可以分为 2 个亚族, 每个亚族内的基因具有相似的基因结构和理化性质。以 *ZmCOBL03* 为候选基因开展基因编辑, 采用双靶标位点的设计思路, 利用农杆菌介导的玉米遗传转化技术和 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 成功获得 *ZmCOBL03* 基因靶向突变的玉米株系。表型分析证实, *ZmCOBL03* 基因突变后严重影响了玉米的正常发育, 表现为植株极端矮化且生殖生长受到抑制, 证实 *ZmCOBL03* 基因在植物细胞壁纤维素合成中发挥重要作用。

关键词: 玉米; COBRA; *ZmCOBL03*; 基因敲除

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Analysis of COBRA Gene Family and Gene Editing of *ZmCOBL03* in Maize

HAO Jing-jie^{1,2}, ZHAO Fang-fang³, CHEN Zi-qi², YIN Yue-jia², GUO Jia², ZHANG Chuang²,
YU Zhi-jia^{1,2}, SUN Jia-qi², WU Wei-lin¹, LIU Xiang-guo^{1,2}

(1. College of Agriculture, Yanbian University, Yanji 133002;

2. Agricultural Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033;

3. College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China)

Abstract: The sequence characteristics, evolutionary relationships with other species and tissue-specific expression patterns of 10 COBRA family members were analyzed by bioinformatics method. The results showed that all the 10 COBRA family genes contained CCVS conserved domains and were localized in the cell membrane. The results of phylogenetic analysis showed that the family could be divided into two subfamilies, and the genes in each subfamily had similar gene structure and physical and chemical properties. Further research focused on the significant member *ZmCOBL03* as a candidate gene for gene editing. In this study, using a dual target site design strategy, maize lines with targeted mutations of the *ZmCOBL03* gene were successfully obtained through maize genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and the CRISPR/Cas9 gene editing technology. Phenotypic analysis confirmed that the mutation of *ZmCOBL03* gene seriously affected the normal development of maize, which showed dwarf plants without female and male panicle, and confirmed that *ZmCOBL03* gene played an important role in plant cell wall cellulose synthesis.

Key words: Maize; COBRA; *ZmCOBL03*; Gene knockout

录用日期: 2022-11-30

基金项目: 吉林省农业科学院(中国农业科技东北创新中心)基本科研经费项目(KYJF2023DX006)、吉林省科技发展计划项目(20220101330JC)、长春市科技发展计划项目(21ZY13)、吉林省农业科技创新工程研究生基金项目(CXGC2021RCY039)

作者简介: 郝竞杰(1998-), 硕士, 主要从事玉米基因功能验证方面的研究。E-mail: 997986309@qq.com

吴委林和刘相国为本文通信作者。E-mail: wlwu@ybu.edu.cn E-mail: lxgyj@cjaas.com

玉米是重要的粮食作物、青贮饲料和能源作物^[1]。随着国内农业发展新形势变化,玉米子粒机械化收获已成为未来我国玉米产业发展的必然趋势^[2]。目前,我国玉米品种选育重点已经从传统的大穗高产向更适合子粒机收的脱水快、抗倒伏等方向转型^[3]。茎秆倒伏与茎秆自身的强度密切相关,茎秆强度越高,抗倒伏性越强。茎秆强度通常与纤维素、半纤维素和木质素的含量成正相关^[4,5]。纤维素是控制细胞各向异性生长的代原细胞壁和次级细胞壁的主要成分,次级细胞壁的细胞伸长完成后沉积,对植物组织的结构支持至关重要^[6]。适当的纤维素合成需要额外的蛋白质,如COBRA 蛋白^[7]。

COBRA 家族是由 COBRA-Like(COBL)蛋白组成的一类糖基磷脂酰肌醇(glycosyl-phosphatidyl inositol, GPI)锚定蛋白家族,普遍存在于高等植物和藻类中,参与细胞壁中纤维素的合成和沉积,进而影响细胞分裂和扩张^[8],目前已报道的 COBRA 家族成员主要在调节细胞壁中纤维素微纤丝的合成及沉积中发挥重要作用。Benfey 等^[9]在模式作物拟南芥中首次报道, *AtCOBRA* 突变体中细胞异常扩张引起根系膨大及生长速度异常。Hauser 等^[10]进一步证实,突变体中纤维素微纤丝沉积发生紊乱,结晶化纤维素含量显著降低,表明拟南芥 *AtCOBRA* 基因通过控制细胞壁中纤维素的定向沉积和形成进而维持细胞的正常生长。COBRA 蛋白在维持植物组织机械强度中也发挥重要作用。水稻 Brittle Culm 1(BC1)突变导致组织机械强度降低,表现出茎秆和叶片易折断的表型^[11];拟南芥 *AtCOBL10* 调控花粉管伸长^[12];棉花 *GhCOBL9A* 影响细胞伸长^[13];高粱 *SbCOBL01* 在纤维素合成中起主要作用^[14]。COBRA 家族生物信息分析和鉴定方面,随着测序成本降低和技术进步,越来越多植物基因组数据不断公开,COBRA 家族的鉴定工作也陆续报道,如拟南芥^[15]、水稻^[16]、番茄^[17]、冬枣^[18]和杨树^[19]等。玉米中^[20]初步开展过 COBRA 基因家族分析发现 9 个成员,玉米 COBRA 家族成员功能研究目前报道较少。为了深入了解玉米 COBRA 家族,本研究分析玉米 COBRA 家族 10 个成员的序列特征、与其他物种的进化关系和组织特异性表达模式,并进一步以重要成员 *ZmCOBL03* 为候选基因开展基因编辑研究工作。

1 材料与方法

1.1 COBRA 基因家族生物信息学分析

在 MaizeGDB(<https://maizegdb.org/>)上对 *ZmCOBL* 基因的蛋白质序列进行搜索,根据拟南芥 *AtCOBL*

基因家族的信息经过 Blast 比对,筛选出玉米 COBRA 基因家族蛋白,以 *E-value* 小于 0.01 进行筛选,共获得 10 个 *ZmCOBL* 蛋白质序列。为了确定序列的准确性,用 CDD-search 和 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对筛选到的序列的结构域进行鉴定,结果一致。将序列提交到 MEME 在线软件(<http://meme-suite.org/index.html>),选择 motif 数量为 10,长度为 6~50,将搜索到的序列利用 TBtools 进行可视化。利用 ClustalW 对谷子、小麦、高粱、水稻和玉米的 COBRA 蛋白序列进行比对后,利用 MEGA7.0 构建系统发育树。发育树算法选择最大似然(Maximum likelihood)法,bootstrap 1 000 次。将玉米、水稻、小麦和高粱的基因组进行 Blast 比对,将比对结果提交至 MCscanX 进行分析,将分析结果利用 TBtools(<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>)进行可视化。在 NCBI 上下载玉米的转录组数据(GSE27004),利用 TBtools 绘制玉米 *ZmCOBL* 基因在不同部位的表达模式图。

1.2 实验材料

菌种为大肠杆菌菌株 TOP10 和农杆菌菌株 EHA105,载体为 pXG001,受体材料为玉米自交系 KN5585(以上由吉林省农业科学院农业生物技术研究所以保存提供)。

1.3 试剂与药品

核酸染料、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购于北京康为世纪公司(中国);2×Taq Plus Master Mix 购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司(中国);琼脂糖购于 TaKaRa 生物有限公司(日本);CTAB 购于生工生物工程股份有限公司(中国);其他实验药品均购于北京鼎国生物科技股份有限公司(中国)。

1.4 引物列表

表 1 PCR 检测引物列表
Table 1 List of primers for PCR detection

引物名称 Primer name	序列 Sequence
CRISPR-CAS9-F	CGATCCGTGTCTCGTACAGG
CRISPR-CAS9-R	AGATGATCGCCAAGAGCGAG
SG-F	TCCTTCTATGTACAGTAGGACACAGTG
SG-R	GGAGAACACATGCACACTAAAAAGA
ZmCOBL03-F	GTCGTAAGTAGAATGCC
ZmCOBL03-R	GTACCTCACCTCCAGAA

1.5 载体构建及农杆菌介导的遗传转化

用 *Pst* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶对 CRISPR-Cas9 载体分别酶切,酶切产物进行电泳分离,纯化

回收。用T4连接酶将靶标位点序列与CRISPR-Cas9酶切后回收产物进行连接。将连接产物转化到感受态大肠杆菌中,涂板,挑选阳性单菌落,进行摇菌,菌液PCR验证无误后,提取质粒并进行双酶切验证,保存菌落PCR和双酶切验证结果均准确的阳性菌株。重新提取质粒后通过农杆菌介导的转化方法^[21],侵染玉米幼胚,最终获得再生植株即转基因组培苗T₀代植株,之后移栽至温室,通过自交授粉收获种子。

1.6 转化植株目标基因靶位点序列检测

在T₀代玉米6叶1心期时对叶片进行取样,取适量叶片装入离心管中,使用CTAB方法^[22]提取DNA,以提取的DNA为模板进行PCR扩增,PCR产物送往吉林省库美生物技术有限公司进行测序。

2 结果与分析

2.1 COBRA基因家族生物信息学分析

玉米中10个COBRA基因分别位于玉米1、2、5、7、9号染色体上,根据其在染色体上的物理位置的先后分别命名为ZmCOBL01~ZmCOBL10(表2)。其中,1号和7号染色体上各分布3个成员,5号和9号染色体上分布1个成员,2号染色体上分布两个成员,说明COBRA基因在数染色体上呈不均匀分布(图1)。利用玉米、小麦、水稻、谷子、高粱的COBRA蛋白序列构建了系统进化树,玉米COBRA基因家族的进化分析结果将玉米COBRA蛋白分为3组。为进一步了解COBRA家族的进化机制,选取另外3个禾本科植物,水稻、小麦和高粱的COBRA基因进行共线性分析,结果显示,玉米于水稻、小麦、高粱分别有2、8、2个共线性基因对。为探究蛋白功能,进行蛋白保守基序预测,结果发现,10个COBRA蛋白中

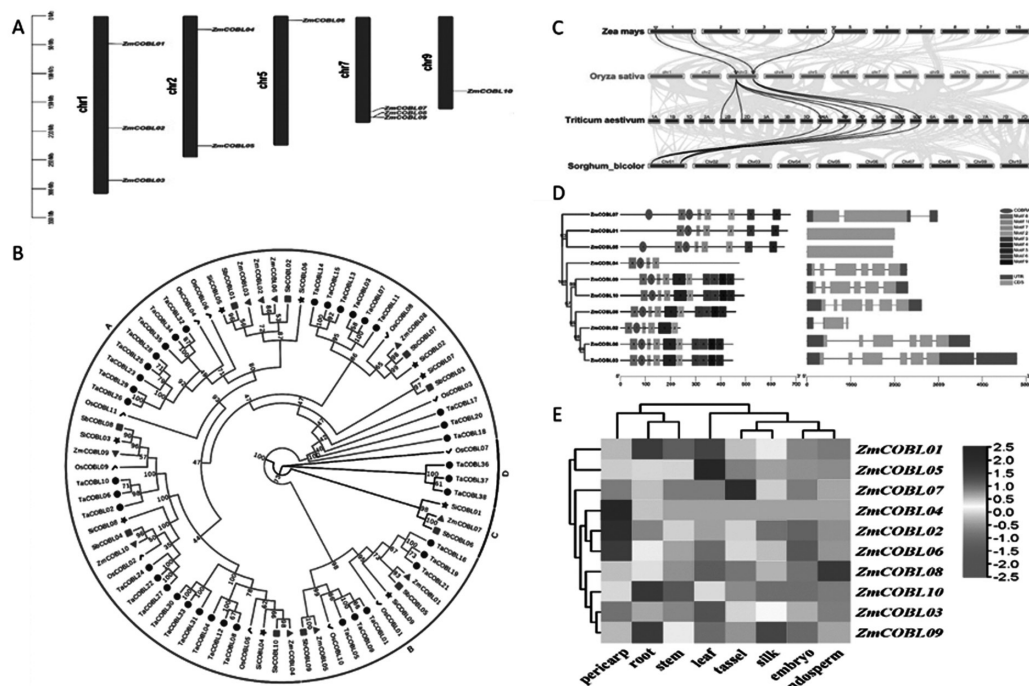
共有10种主要保守基序,其中,motif 1为COBRA结构域,且较为保守。10个成员均含有COBRA结构域,ZmCOBL05和ZmCOBL07含有2个COBRA,所有基因含有motif 7、motif 8和motif 10,9个成员含有motif 2,8个成员含有motif 3和motif 4,6个成员含有motif 8,5个成员含有motif 6和motif 9。根据转录组数据,分析玉米COBRA基因的组织特异性表达模式。结果显示,ZmCOBL05和ZmCOBL04分别在叶片和种皮中具有组织特异性;ZmCOBL01在根和叶中高表达;ZmCOBL09在根和花丝中高表达;ZmCOBL02在种皮和花丝中高表达;ZmCOBL07在根、雄穗和胚乳中表达;ZmCOBL10在种皮、根和茎中表达。ZmCOBL06、ZmCOBL08和ZmCOBL03则是在更多组织部位中高表达;ZmCOBL06在种皮、根、茎和花丝中表达;ZmCOBL08在种皮、根、茎和胚乳中表达;ZmCOBL03在种皮、根、茎和雄穗中表达。考虑到ZmCOBL06、ZmCOBL08和ZmCOBL03在多个组织部位高表达,推测这3个基因对玉米生长发育较为重要,研究选取ZmCOBL03基因开展后续的功能验证。

2.2 ZmCOBL03基因结构预测

利用Softberry网站(www.softberry.com)对ZmCOBL03基因的结构进行预测,结果显示,序列长度为4 754 bp,该编码基因来自于正链,含有6个外显子(图2)。利用ExPASy在线工具(<https://www.expasy.org/>)对ZmCOBL03基因蛋白质进行理化性质分析,蛋白质相对分子质量为49 599.87,氨基酸有448个。等电点为8.88,为碱性蛋白;不稳定系数小于40,为稳定蛋白;蛋白质总平均亲水性是-0.146,是亲水性蛋白。利用在线工具TMHMM-2.0对ZmCOBL03进行了跨膜结构域分析,结果表明,该基因蛋

表2 玉米COBRA基因家族成员基因号及MaizeGDB名称
Table 2 Maize COBRA gene family member gene number and MaizeGDB name

名称 Name	基因号 Gene ID	MaizeGDB名称 MaizeGDB name
ZmCOBL01	Zm00001eb014120	roothair defective3
ZmCOBL02	Zm00001eb035300	/
ZmCOBL03	Zm00001eb057580	cobra-like3
ZmCOBL04	Zm00001eb075290	cobra-like9
ZmCOBL05	Zm00001d0072080	cobra-like8
ZmCOBL06	Zm00001eb214720	cobra-like4
ZmCOBL07	Zm00001eb323040	cobra-like5
ZmCOBL08	Zm00001eb326990	cobra-like6
ZmCOBL09	Zm00001eb327000	cobra-like7
ZmCOBL10	Zm00001eb393070	brittle stalk2

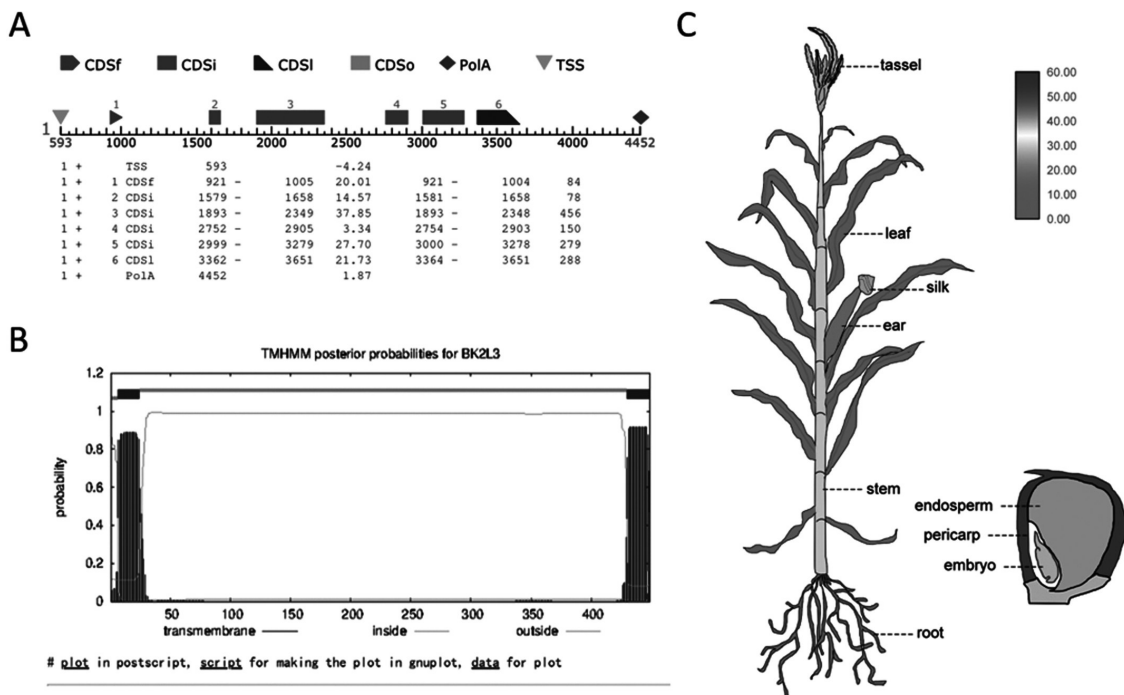


注:A为玉米COBRA基因家族染色体定位;B为玉米COBRA基因家族进化树;C为玉米、水稻、小麦和高粱COBRA基因家族共线性分析;D为玉米COBRA保守基序;E为玉米COBRA基因家族的组织特异性表达模式。

Note: A, Chromosomal location of COBRA gene family in maize; B, Evolutionary tree of COBRA gene family in maize; C, Collinearity analysis of COBRA gene families in maize, rice, wheat and sorghum; D, COBRA conservative motif of maize; E, Tissue specific expression pattern of COBRA gene family in maize.

图1 COBRA基因家族生物信息学分析

Fig.1 Bioinformatics analysis of COBRA gene family



注:A为ZmCOBL03基因结构;B为ZmCOBL03基因跨膜结构;C为ZmCOBL03不同组织部位表达量。

Note: A, ZmCOBL03 gene structure; B, transmembrane structure of ZmCOBL03 gene; C, expression levels of ZmCOBL03 in different tissue parts.

图2 ZmCOBL03基因生物信息学分析

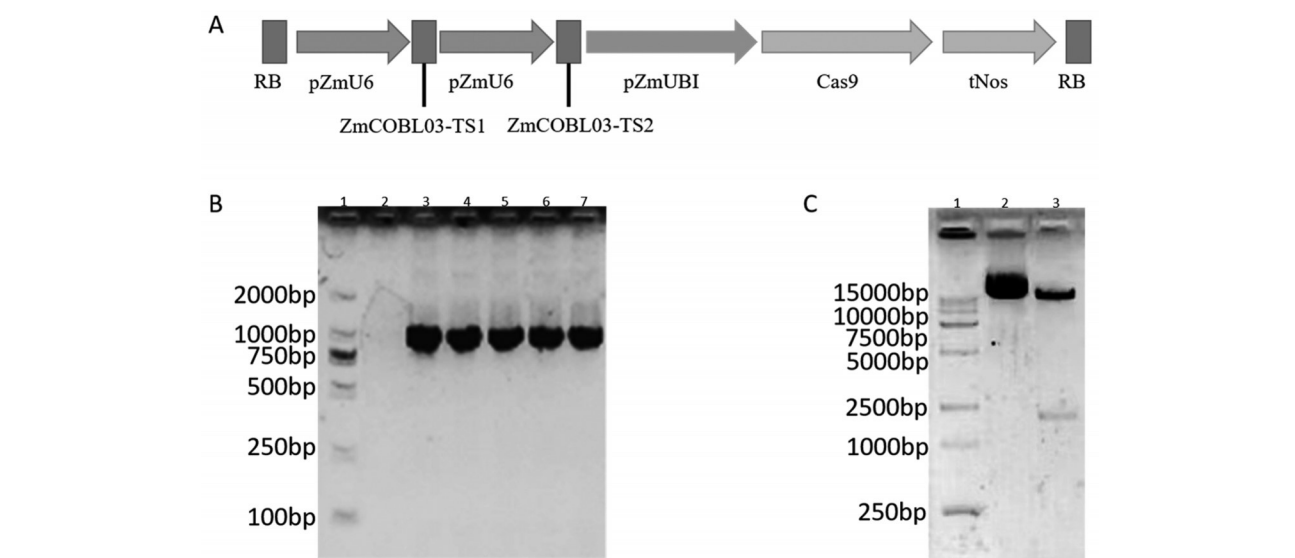
Fig.2 Bioinformatics analysis of ZmCOBL03 gene

白长度有449个氨基酸,预测到2个跨膜结构,胞内在1~6,跨膜螺旋在7~24,胞外在25~429,跨膜螺旋在430~448,胞内在449。亚细胞定位预测结果显示ZmCOBL03定位于质膜上。表达谱分析表明,ZmCOBL03在节间伸长区表达最快,并且随着节间组织进入沉积次级壁的过渡和成熟区,其表达量下降。ZmCOBL03在茎的成熟细胞中也以中等水平表达的结果表明,它可能在单子叶植物的细胞发育中发挥更广泛的作用,而不仅仅是细胞扩增。

2.3 ZmCOBL03基因敲除载体构建及材料创制

在MaizeGDB数据库中查询ZmCOBL03基因的

DNA序列,根据基因的CDS区分析相应的基因结构,明确基因的跨膜结构域保守区域。为提高敲除效率,采用构建双靶点载体的策略,利用CRISPR-P 2.0网站[CRISPR-P v2.0(hzau.edu.cn)]设计两个敲除ZmCOBL03基因的靶标位点,两个靶点均位于第3外显子。靶点一的序列为TTTCGGCATATCGGCG-CACCTGG,靶点二的序列为CTTTCTTGCAGCAAT-GGGGTGGG(图3)。对构建好的载体进行酶切验证,并利用PCR进行鉴定。结果证明,基因敲除载体成功导入材料中,利用农杆菌介导的幼胚遗传转化方法获得了4个转基因转化事件:#1、#2、#3、#4。



注:A为ZmCOBL03基因敲除载体构建及靶标位置;B为菌落PCR,1为Maker2000,2为水,3~7为样品;C为ZmCOBL03基因敲除载体的酶切验证,1为Maker15000,2为质粒,3为双酶切质粒。
Note: A, Construction and target location of ZmCOBL03 gene knockout vector; B, Colony PCR, lane 1, Maker2000, lane 2, water, lane 3-7, sample; C, Enzyme digestion verification of ZmCOBL03 gene knockout vector, lane 1, Maker15000, lane 2, plasmid, lane 3, double enzyme digestion plasmid.

图3 载体构建及酶切验证

Fig.3 Vector construction and enzyme digestion verification

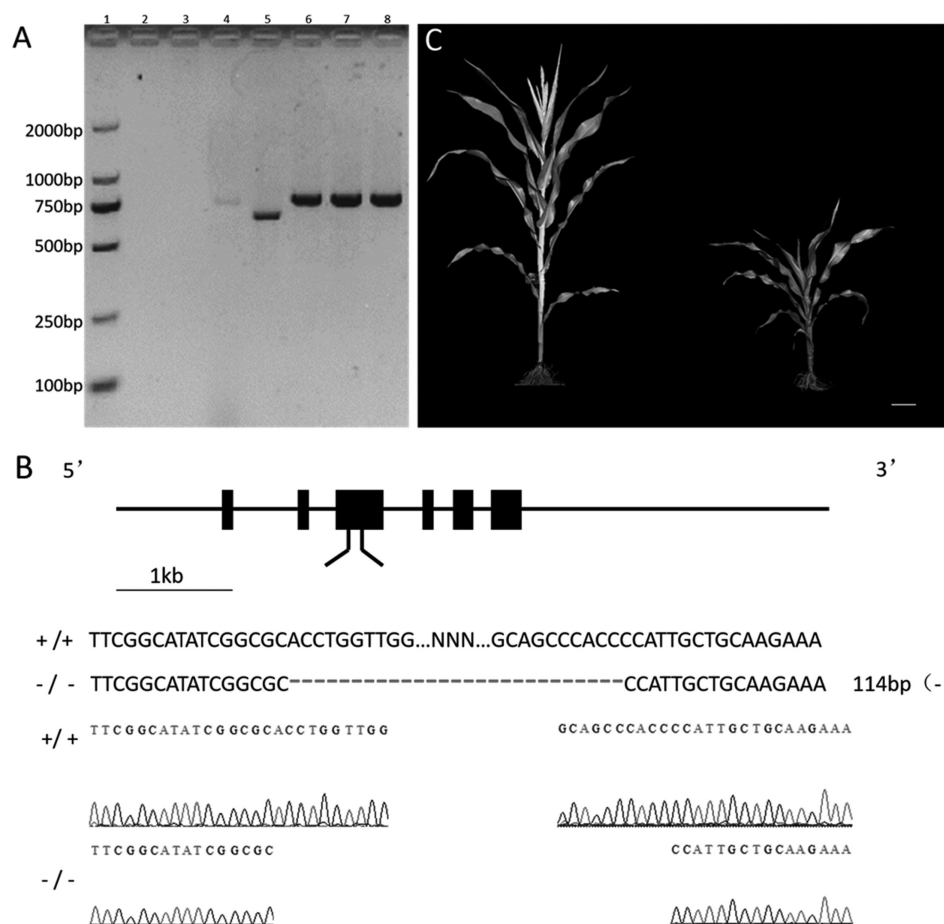
2.4 ZmCOBL03基因敲除植株基因型及表型

将转化后的玉米愈伤组织利用双丙氨磷筛选,诱导发芽、生根后,转入温室进行炼苗、移栽,获得T₀代转基因玉米幼苗,利用CTAB法提取玉米基因组,根据ZmCOBL03的基因序列利用Primer Premier 5.0^[23]设计引物,即能够检测到转化事件#1的扩增条带大小小于野生型对照和其他转化事件(图4)。通过测序结果得知,该突变体于1914bp处缺失111bp。在T₁代材料中,根据目的基因检测结果,发现敲除该基因后的突变体材料植株矮化严重且无雄穗与雌穗。

3 结论与讨论

本文采用生物信息学手段鉴定出10个COBRA基因家族成员,分别位于1、2、5、7、9号染色体上。

通过共线性分析发现,该基因在禾本科植物中相对保守。分析转录组数据发现,ZmCOBL03在种皮、根和茎中均有表达。针对ZmCOBL03蛋白理化性质、亲水性等分析,结果表明,该蛋白为亲水性蛋白,有两个跨膜结构域。COBRA基因家族在水稻、小麦、高粱中分别鉴定出11、38、11个成员。因为玉米、水稻和高粱都是禾本科二倍体植物,家族成员数量大致相同;小麦是杂合六倍体植物,所以家族成员远多于玉米、水稻和高粱且成员数量接近3倍。表达谱分析表明,ZmCOBL03在整个植物的多个组织中均有所表达,这种广泛的基因表达模式与ZmCOBL03在多个组织中初生细胞壁生物合成中的作用一致。Siobhan M. Brady等^[24]研究结果表明,ZmCOBL03可能是AtCOB的功能性同源物,其表达与4个主要成



注: A 为 PCR 鉴定 *ZmCOBL03* 突变体, 1 为 Maker2000, 2、3 为水, 4 为 CK, 5~8 为 #1、#2、#3、#4; B 为玉米 *ZmCOBL03* 基因敲除阳性植株靶标区域测序; C 为玉米 *ZmCOBL03* 基因敲除突变体植株表型, 左为 CK, 右为 KO, 比例尺: 10 cm。

Note: A, The mutant *ZmCOBL03* was identified by PCR, lane 1, Maker2000, lane 2~3, water, lane 4, CK, lane 5~8, #1, #2, #3, #4; B, Sequencing of *ZmCOBL03* gene knockout positive plant target region; C, Plant phenotype of *ZmCOBL03* gene knockout mutant, left, CK, right, KO, scale, 10 cm.

图4 突变体基因型及表型

Fig.4 Mutant genotype and phenotype

壁玉米 *CesA* 基因 *ZmCesA1*、*ZmCesA2*、*ZmCesA7*、*ZmCesA8* 密切相关, 且 4 个基因中的 3 个基因 *ZmCesA1*、*ZmCesA7* 和 *ZmCesA8* 也被证明从初级至次级壁形成的过渡的组织中表达。

Brittle Stalk2(BK2)是玉米首个解析基因功能的 COBRA 家族成员^[25]。研究发现, *BK2* 会降低叶片和成熟茎中纤维素占总细胞壁质量的比例^[26]。目前, *ZmBK2L3*(*ZmCOBL03*)基因在番茄中过表达后导致番茄果实的果皮厚度明显增加, 纤维素质量比明显增高, 货架期明显延长, 推测 *ZmBK2L3* 基因表达量的增加会通过增加果皮厚度导致番茄果实的脱水速率降低^[27]。认为在玉米中敲除 *ZmCOBL03* 基因会降低种皮厚度, 进而得到脱水更快、更适机收的材料。本实验通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对 *ZmCOBL03* 进行基因敲除, 获得了敲除后的突变体材料, *ZmCOBL03* 突变体植株表现出矮化且无雄穗与雌穗

的发育障碍表型, 导致突变体植株无法繁育后代。Benjamin T Julius 等在 2021 年于 Plant Cell 发表的文章中表明, 通过在 B73 受体材料中 EMS 诱变得到的突变体表型也呈现出发育障碍。由此证明, *ZmCOBL03* 不止在纤维素合成中发挥作用, 也在玉米的正常生长发育中发挥重要作用。敲除或诱变 *ZmCOBL03* 基因都会影响玉米的正常生长发育, 鉴于此种情况, 后续可以通过 RNAi 的方法^[28, 29] 尝试抑制该基因表达防止产生极端发育障碍的植株, 从而更加深入的研究 *ZmCOBL03* 基因功能, 或者通过超表达该基因来进一步探究该基因功能及机理。

参考文献:

- [1] 刘纪麟. 玉米育种学[M]. 北京: 农业出版社, 1991.
- [2] 李少昆, 王克如, 谢瑞芝, 等. 机械粒收推动玉米生产方式转型[J]. 中国农业科学, 2018, 51(10): 1842-1844.
- LI S K, WANG K R, XIE R Z, et al. Mechanical grain harvesting pro-

- motes transformation of maize production mode[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(10): 1842–1844. (in Chinese)
- [3] SCHMIDT J L, HALLAUER A R. Estimating harvest date of corn in the field[J]. *Crop Science*, 1966, 6(3): 227–231.
- [4] 王夏青, 宋伟, 张如养, 等. 玉米茎秆抗倒伏遗传的研究进展[J]. *中国农业科学*, 2021, 54(11): 2261–2272.
- WANG X Q, SONG W, ZHANG R Y, et al. Genetic research advances on maize stalk lodging resistance[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(11): 2261–2272. (in Chinese)
- [5] 李妍妍, 景希强, 丰光, 等. 玉米倒伏的主要相关因素研究进展[J]. *辽宁农业科学*, 2013(4): 47–51.
- LI Y Y, JING X Q, FENG G, et al. Progress in research on the main factors associated with maize failure[J]. *Liaoning Agricultural Sciences*, 2013(4): 47–51. (in Chinese)
- [6] NICHOLAS C C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1996, 47(1): 445–476.
- [7] SCHINDELMAN G, MORIKAMI A, JUNG J, et al. COBRA encodes a putative GPI-anchored protein, which is polarly localized and necessary for oriented cell expansion in *Arabidopsis*[J]. *Genes Dev.*, 2001(15): 1115–1127.
- [8] SMITH L G, OPPENHEIMER D G. Spatial control of cell expansion by the plant cytoskeleton, *Annu[J]. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2005, 21: 271–295.
- [9] BENFEY P N, LINSTAD P J, ROBERTS K, et al. Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis[J]. *Development*, 1993, 119(1): 57–70.
- [10] HAUSER M T, MORIKAMI A, BENFEY P N. Conditional root expansion mutants of *Arabidopsis*[J]. *Development*, 1995, 121(4): 1237–1252.
- [11] LI Y H, QIAN Q, ZHOU Y H, et al. BRITTLE CULM1, which encodes a COBRA-like protein, affects the mechanical properties of rice plants[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(9): 2020–2031.
- [12] LI S, GE F R, XU M, et al. *Arabidopsis* COBRA-LIKE 10, a GPI-anchored protein, mediates directional growth of pollen tubes[J]. *Plant J.*, 2013, 74(3): 486–497.
- [13] NIU E L, FANG S, SHANG X G, et al. Ectopic expression of GhCOBL9A, a cotton glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein encoding gene, promotes cell elongation, thickening and increased plant biomass in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Mol. Genet. Genomics*, 2018, 293(5): 1191–1204.
- [14] 元志成, 柯余生, 吴富进, 等. 高粱COBRA基因家族全基因组的鉴定和表达分析[J]. *分子植物育种*, 2020, 49(10): 33–41.
- YUAN Z C, KE Y S, WU F J, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the COBRA gene family in sorghum[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2020, 49(10): 33–41. (in Chinese)
- [15] SCHINDELMAN G, MORIKAMI A, JUNG J, et al. COBRA encodes a putative GPI-anchored protein, which is polarly localized and necessary for oriented cell expansion in *Arabidopsis*[J]. *Genes Dev.*, 2021, 15(9): 1115–1127.
- [16] BRADY S M, SONG S, DHUGGA K S, et al. Combining expression and comparative evolutionary analysis[J]. *Plant Physiol*, 2007, 143(1): 172–187.
- [17] CAO Y, TANG X F, GIOVANNONI J, et al. Functional characterization of a tomato COBRA-like gene functioning in fruit development and ripening[J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12: 211.
- [18] 盛松柏, 田菊, 庞晓明, 等. 冬枣COBRA基因家族全基因组鉴定及表达分析[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(1): 61–68.
- SHENG S B, TIAN J, PANG X M, et al. Genome-wide identification, and expression analysis of COBRA gene family in jujube[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(1): 61–68. (in Chinese)
- [19] YE X, KANG B G, OSBURN L D, et al. The COBRA gene family in *populus* and gene expression in vegetative organs and in response to hormones and environmental stresses[J]. *Plant Growth Regul*, 2009, 58(2): 211–223.
- [20] 潘倚天, 黄敏. 玉米COBRA家族成员全基因组鉴定与表达模式分析[J]. *甘肃农业科技*, 2022, 53(2): 21–23.
- PAN Y T, HUANG M. Genome-wide identification and expression pattern analysis of COBRA family members in maize[J]. *Gansu Agricultural Science and Technology*, 2022, 53(2): 21–23. (in Chinese)
- [21] GOULD J, DEVEY M, HASEGAWA O, et al. Transformation of *Zea mays* L. using *agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex[J]. *Plant Physiology*, 1991, 95: 426–434.
- [22] DOYLE F, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochem[J]. Bull*, 1987, 19(1): 11–15.
- [23] SINGH V K, MANGALAM A K, DWIVEDI S, et al. Primer premier: program for design of degenerate primers from a protein sequence[J]. *Biotechniques*, 1998, 24(2): 318–319.
- [24] SIOBHAN M B, SHUANG S, KANWARPAL S D, et al. Combining expression and comparative evolutionary analysis[J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(1): 172–187.
- [25] BENJAMIN T J, TYLER J M, RACHEL A M, et al. Maize Brittle Stalk2-Like3, encoding a COBRA protein, functions in cell wall formation and carbohydrate partitioning[J]. *Plant Cell*, 2021, 33(10): 3348–3366.
- [26] CHING A, DHUGGA K S, APPENZELLER L, et al. Brittle stalk 2 encodes a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored protein that affects mechanical strength of maize tissues by altering the composition and structure of secondary cell walls[J]. *Planta*, 2006, 224(5): 1174–1184.
- [27] SINDHU A, LANGEWISCH T, OLEK A, et al. Maize Brittle stalk2 encodes a COBRA-like protein expressed in early organ development but required for tissue flexibility at maturity[J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(4): 1444–1459.
- [28] LIU X L, XIE X Z, ZHENG C K, et al. RNAi-mediated suppression of the abscisic acid catabolism gene *OsABA8ox1* increases abscisic acid content and tolerance to saline-alkaline stress in rice (*Oryza sativa* L.)[J/OL]. *The Crop Journal*, 2021, 8(2): <https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.06.011>.
- [29] MIRIAM M S, JULIO C M I, FRANCISCO B. New transcriptomic insights in two RNAi wheat lines with the gliadins strongly down-regulated by two endosperm specific promoters[J]. *The Crop Journal*, 2022, 10(1): 194–203.

(责任编辑:朴红梅)