

玉米 *Zm00001eb009320* 基因在拟南芥中抗 *PstDC3000* 的研究

苏博¹, 王璐², 姚佩琳¹, 徐礼生¹, 丁婷², 江海洋³

(1. 宿州学院生物与食品工程学院, 安徽 宿州 234000; 2. 安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036; 3. 安徽农业大学作物抗逆育种与减灾国家地方联合工程实验室, 合肥 230036)

摘要: WAK 蛋白家族成员可直接或间接参与和诱导植物体本身产生防御机制, 对植物病原菌的侵入起到抵抗和杀灭的效果。课题组前期研究获得玉米 *Zm00001eb009320* 基因, 隶属于 WAK 蛋白家族。为探究该基因在抗病中的作用, 通过基因克隆技术, 构建 *Zm00001eb009320* 基因过表达载体, 侵染哥伦比亚野生型的拟南芥植株, 筛选得到拟南芥转基因阳性株系, 对其进行两代自交种植后, 开展抗病性实验。结果表明, 接种丁香假单胞菌番茄致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *Tomato DC3000*, *PstDC3000*) 后, *Zm00001eb009320* 基因的过表达拟南芥植株体内的水杨酸 (SA) 信号通路可能被诱导, 使得转基因植株对 *PstDC3000* 具有一定的抗病效果。

关键词: 玉米; 转基因拟南芥; 信号通路

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Study on the Resistance of Maize *Zm00001eb009320* Gene to *PstDC3000* in *Arabidopsis*

SU Bo¹, WANG Lu², YAO Pei-lin¹, XU Li-sheng¹, DING Ting², JIANG Hai-yang³

(1. School of Biological and Food Engineering, Suzhou University, Suzhou 234000; 2. School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036; 3. National Engineering Laboratory of Crop Stress Resistance Breeding, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Members of the WAK protein family can directly or indirectly participate in and induce plant defense mechanisms against pathogen invasion. The research team previously obtained the maize *Zm00001eb009320* gene, which belongs to the WAK protein family. In order to explore the role of this gene in disease resistance, this study used gene cloning technology to construct an overexpression vector of *Zm00001eb009320* gene, infect Colombian wild-type *Arabidopsis* plants, screen for transgenic positive *Arabidopsis* lines, and conduct disease resistance experiments after two generations of self crossing planting. The results showed that after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato DC3000* (*PstDC3000*), overexpression of the *Zm00001eb009320* gene may induce the salicylic acid (SA) signaling pathway in *Arabidopsis* plants, making transgenic plants resistant to *PstDC3000*.

Key words: Maize; Transgenic *Arabidopsis*; Signaling pathway

录用日期: 2024-07-01

基金项目: 国家面上基金项目(32172477)、作物抗逆育种与减灾国家地方联合工程实验室开放基金资助项目(NELCOF20230106)、农田土壤污染防治与修复技术国家工程实验室项目(NEL-SCRT002)、安徽省教育厅重点科学基金项目(2023AH052217)、宿州学院校级重点科研项目(2022yzd04)、安徽省自然科学基金重点项目(2022AH051384, 2022AH051375)

作者简介: 苏博(1990-), 女, 安徽淮北人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为玉米病害机制。E-mail: subowsm31415@163.com
丁婷和江海洋为本文通信作者。

玉米(*zea mays*)是我国主要的粮食作物之一^[1], 在保障国家粮食安全中具有举足轻重的地位^[2]。目前, 玉米生产上的病害有数十种之多^[3], 其中玉米小斑病是威胁玉米产量的重要叶部病害之一, 在全世界玉米产区普遍发生, 严重影响玉米产量^[4-6], 解析抗病性遗传机制、选育抗病品种是实现病害绿色防控和保障粮食安全的有效策略。目前为止, 玉米小斑病抗病基因研究甚少。随着生物技术的不断发展及在玉米分子育种中的应用, 其在玉米抗病相关基因的挖掘分析、明确作用机制及加快培育抗病虫玉

米品种等方面发挥着重要作用^[7]。

植物具有一种复杂的防御机制,用于接收和传递免疫信号。植物免疫识别受体(PRRs)是一类位于细胞质膜上的受体蛋白,能够感知病原体入侵并触发宿主免疫反应,如活性氧(ROS)的爆发^[8]。细胞壁相关激酶(WAKs)和 WAK 样激酶(WAKLs)是一类新的植物 PRRs,在植物抵抗各种真菌疾病中发挥着重要作用^[9]。其具体的抗性分子机制尚不清楚。因此,探究 WAK 基因家族成员的分子进化机制及不同成员的功能特性,对植物抗逆分子育种具有较为重要的理论和实践意义。

在前期的研究中,本课题组王其等^[10-11]利用转录组测序技术,对 DZSY21 喷洒接种到玉米植株体内后诱导玉米产生抗病性的分子机制进行了分析,筛选得到 *Zm00001eb009320* 等可能具备抗病效果的基因。本研究以 *Zm00001eb009320* 基因作为研究对象,通过目的基因的扩增、拟南芥过表达载体构建、农杆菌转化等技术获得转基因拟南芥,对其抗病性进行初步研究,初步阐明候选基因在植物抗病中的作用机制,为进一步深入研究玉米 *Zm00001eb009320* 基因的功能和作用机制提供相关理论基础,也为培育抗病新品种和农业绿色增产提供新基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验材料:丁香假单胞菌 *Pst*DC3000 菌株、玉米 B73 自交系 (*Zea mays* L.)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 哥伦比亚野生型 (Col-0)、植物过表达载体 pCAMBIA1305-GFP、大肠杆菌 DH5 α (北京全式金生物技术股份有限公司) 和 GV3101 农杆菌 (上海唯地生物有限公司) 等。实验试剂: 2 \times Phanta Max Master Mix、AceQ qPCR SYBR Green Master Mix、2 \times Taq Master Mix、高保真酶,南京诺唯赞生物科技有限公司;限制性内切酶、T4 连接酶、RNA free water, TaKaRa 公司;凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒,美国 Axygen 公司;卡那霉素(Kan)、氨苄青霉素(Amp)、潮霉素 B(Hn),美国 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 生物信息学分析

通过 NCBI 基因数据库获取 *Zm00001eb009320* 基因的 CDS 及蛋白序列;在 SMART 在线网站 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析蛋白序列和所含保守结构域,进行功能预测;通过 NCBI 基因数据库查找并筛选在其他物种中与之同源性较高的基因的

CDS 序列,并利用 MEGA7.0 构建进化树。

1.2.2 基因克隆

针对 *Zm00001eb009320* 的 CDS 序列,通过 primer 5.0 设计引物,将得到的引物序列在 NCBI 网站进行 blast 特异性,在其上、下游引物的 5' 端加入两个合适且不同的酶切位点。上游引物 *Zm00001eb009320* F: CCCAAGCTTATGGTGGGGCTC;下游引物 *Zm00001eb009320* R: CCGGAATTCTCAATGCAGGGAGCGACT。50 μ L 反应体系:PrimerSTAR Mix 25 μ L,上游及下游引物各 2 μ L,CDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 19 μ L。PCR 反应程序:98 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,共进行 32 个循环;72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。回收纯化的目的片段与 pEASY $^{\circ}$ -Blunt Zero 载体进行连接(克隆载体 0.5 μ L,目的片段 4.5 μ L,37 $^{\circ}$ C 反应 1 h)。

将 pEASY-*Zm00001eb009320* 载体转入大肠杆菌 DH5 α 感受态,加入无抗性的 LB 液体培养基 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1 h,涂布在含有卡那霉素(50 mg/mL)的 LB 平板上 37 $^{\circ}$ C 过夜培养,挑取出单克隆,采用 *Zm00001eb009320F/Zm00001eb009320R* 进行菌液 PCR。PCR 反应体系 25 μ L,挑取阳性克隆于含有卡那霉素的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,然后提取质粒,送安徽通用生物股份有限公司进行测序验证。

1.2.3 重组质粒的构建与农杆菌转化

对测序正确的重组质粒 pEASY-*Zm00001eb009320* 在 37 $^{\circ}$ C 条件下酶切 1 h,酶切选择 50 μ L 反应体系:重组质粒 4 μ L, Buffer 5 μ L, EcoR I 1 μ L, Hind III 1 μ L, ddH₂O 39 μ L。结束后,跑胶进行切胶回收并获得目的片段。*Zm00001eb009320* 目的片段用 pEASY $^{\circ}$ -Blunt Zero 与载体在 4 $^{\circ}$ C 条件下过夜进行连接,获得 pCAMBIA1301a-*Zm00001eb009320* 重组质粒。按照 1.2.2 节的方法转化菌株 DH5 α 感受态、阳性克隆筛选和质粒提取、测序验证等。选择化转法用 pCAMBIA1301a-*Zm00001eb009320* 重组质粒转化农杆菌 GV3101 感受态,在含有卡那霉素和利福平的 LB 固体平板上筛选出单菌落,并用 PCR 法筛选农杆菌阳性菌。

1.2.4 *Zm00001eb009320* 转基因拟南芥阳性植株的获得

实验选取饱满的哥伦比亚野生型(WT)拟南芥种子,经灭菌后置于培养板中培养 1~2 周,将长出的拟南芥移栽到灭菌的营养土(丹麦土:黑土:蛭石=1:1:1)中生长,正常浇水施肥,待其长至开花期时,

用含有目的基因的农杆菌对拟南芥的花序进行侵染。将收取的种子对其清洗与春化,因 p1301a-*Zm00001eb009320* 基因的载体上含有潮霉素(*Hyg*)基因,将拟南芥种子均匀地铺在含有潮霉素抗性的 MS 培养板上进行初筛,7~10 d 后将长出的拟南芥小苗转移至小盆内,培养条件方法和上述一致。通过对 *Zm00001eb009320* 基因进行 PCR 来进一步确定阳性植株。引物序列如下:F:CCCAAGCTTATGGTGC-GGGGCTC; R: CCGGAATTCTCAATGCAGGGAGC-GACT。

为进一步验证,将阳性苗利用相对荧光定量 PCR 技术对 *Zm00001eb0093* 基因在拟南芥中的表达水平进行检测,设计引物:F:CGATGCTCGAGCCAC-GCTAA; R: TTTGGACCTTCCCGCAACC。qPCR 反应体系(20 μ L), CDNA 2 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, SYBR Green 2 μ L, RNase-free Water 6 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 共进行 40 个循环, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s。反应结束后, 导出扩增信号及数据, 在表格中用 Ct 法($\Delta\Delta$ Ct)分析, 其中相对表达值 $RQ=2^{-\Delta\Delta C_t}$ [12]。

1.2.5 转基因拟南芥对 *Pst*DC3000 的抗病实验

本实验采用喷雾法,将配制好的菌悬液均匀地喷洒在 4 周龄大小的转基因和野生型拟南芥幼苗上(用按压式喷壶每个小黄盆大概喷灌 1~3 次),放置于 22 $^{\circ}$ C 的恒温温室内保湿培养 2~3 d, 特定时间内测定相关抗病性。接种 *Pst*DC3000 后,根据其叶片病斑的大小进行统计调查。根据植物细菌病害的分级标准,将其分为 5 级,具体分级情况参考文献[25],根据病情指数计算公式,对其发病情况做出统计;同时,根据植株的发病情况,对不同发病级别的拟南芥发病率进行统计,计算公式如下:

发病率=发病叶片数/调查总叶片数 \times 100%;

病情指数= Σ (各级病叶数 \times 各级代表值)/(调查总叶数 \times 最高级代表值);

防治效果=[(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数] \times 100%。

*Pst*DC3000 处理后拟南芥体内菌体数的统计 [13]: 为测定 *Pst*DC3000 菌体在拟南芥上的繁殖生长能力,采用梯度稀释平板法计数,在拟南芥接种 *Pst*DC3000 后的第 2 天和第 6 天,分别剪取野生型和转基因型拟南芥株系的叶片,混合取样 3 份,每份 3 片,称重并记录。

1.2.6 *Zm00001eb009320* 转基因拟南芥中抗病相关基因表达量分析

为了进一步研究 *Zm00001eb009320* 转基因拟南

芥的作用机制,对病原菌处理 24 h 的植株进行 qRT-PCR,分析信号通路标志基因表达情况,这些基因包括 SA、JA、ET 通路和抗病标志基因 [14-15],其引物序列如表 1 所示。

表 1 信号通路标志基因引物

Table 1 The primers of marker genes in signaling pathway

基因名称 Genes name	引物(5'→3') Primer(5'→3')
<i>PDF1.2-F</i>	CITGTTCTCTTTGCTGCTTTTCGAC
<i>PDF1.2-R</i>	TTGGCTCCTTCAAGGTTAATGCAC
<i>ERF1-F</i>	CCTTCCGAT CAA ATC CGT AAG
<i>ERF1-R</i>	TCCCGAGCC AAA CCC TAA TAC
<i>PR1-F</i>	ACACGTGCAATGGAGTTTGT
<i>PR1-R</i>	TGCAACTGATTATGGTTCCA
<i>AtActin2-F</i>	GGTAACATTGTGCTCAGTGCTGG
<i>AtActin2-R</i>	AACGACCTTAATCTTCATGCT TGC

2 结果与分析

2.1 *Zm00001eb009320* 基因生物信息学分析

通过 NCBI 数据库获取了 *Zm00001eb009320* 基因组 CDS, CDS 区全长为 2 133 bp, 位于 1 号染色体上。此外,通过 ExPASy 网站预测了 *Zm00001eb009320* 基因的蛋白结构,发现了基因的编码蛋白分子量为 76.54 kDa, 等电点为 8.22。同时在 SMART 网站预测了 *Zm00001eb009320* 的蛋白结构域,分子结构如图 1 所示,发现其基因编码包含了细胞壁连接的类受体激酶蛋白保守结构域 pkinase, 可知, *Zm00001eb009320* 基因是隶属于细胞壁连接的类受体激酶蛋白(WAK)家族。

将 *Zm00001eb009320* 基因序列在 NCBI 数据库里 BLAST 出同源性较高的作物基因序列,使用 MEGA7.0 软件构建系统进化树如图 2 所示。由图 2 可知,基因 *Zm00001eb009320* 与高粱基因 *XM002468193.2* 亲缘关系最近。

2.2 转基因拟南芥阳性植株的鉴定

利用农杆菌蘸花法侵染拟南芥哥伦比亚野生型(WT)花序, T_0 代种子经过潮霉素抗性筛选获得 T_1 代阳性植株。待其长至 4 周大时,提取叶片基因组 DNA,使用 *Zm00001eb009320* 基因的特异性引物进行 PCR 鉴定。结合凝胶电泳检测,转基因阳性株系可以扩增出 *Zm00001eb009320* 基因目的片段,大小为 2 133 bp。对 *Zm00001eb009320* 转基因拟南芥的阳性株系进行 qRT-PCR 验证,目的基因在阳性株系中的表达水平显著高于野生型,可用于后续研究(图 3)。

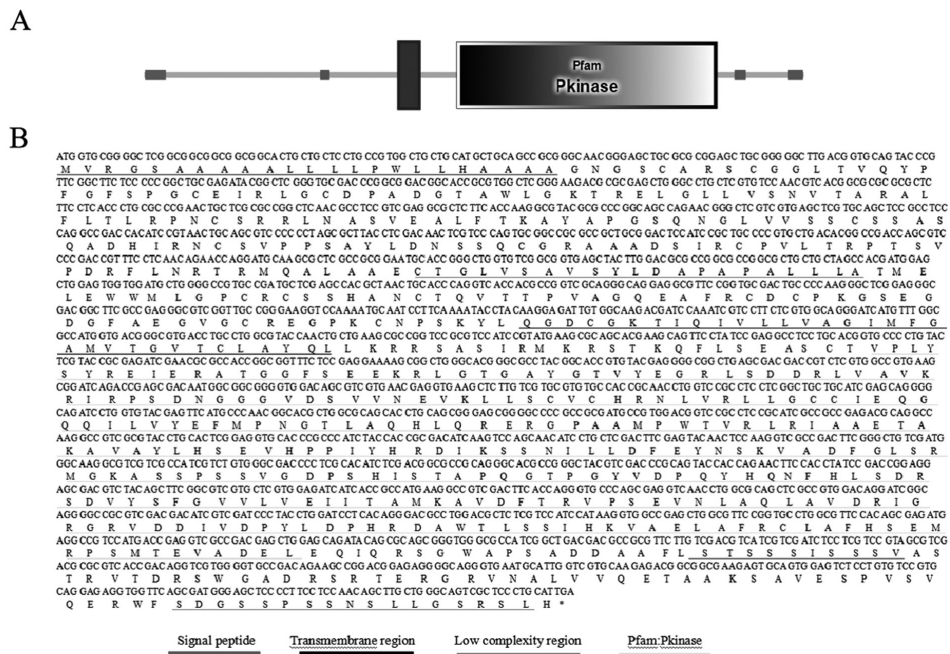


图1 *Zm00001eb009320* 分子结构图

Fig.1 *Zm00001eb009320* molecular structure diagram

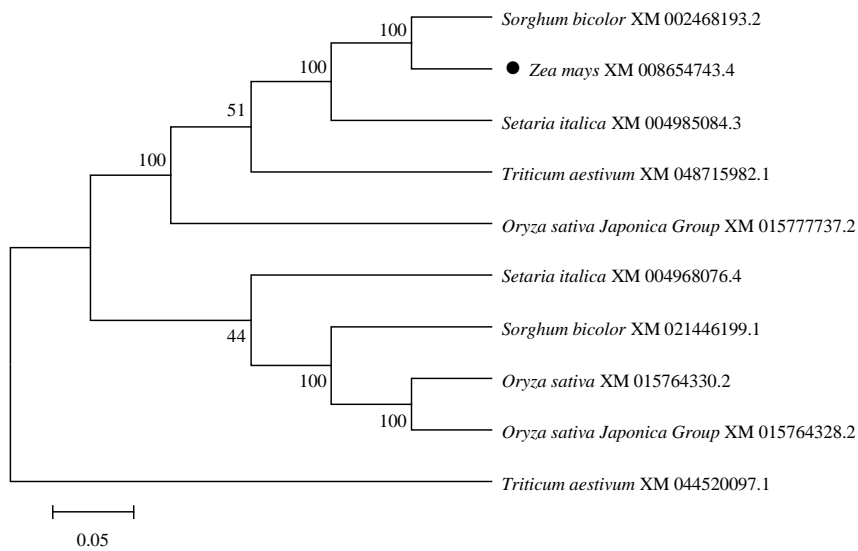


图2 *Zm00001eb009320* 基因进化树分析

Fig.2 Evolutionary tree analysis of gene *Zm00001eb009320*

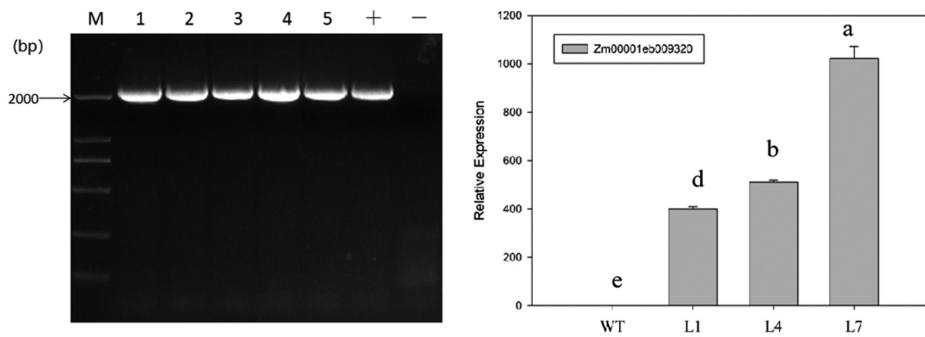


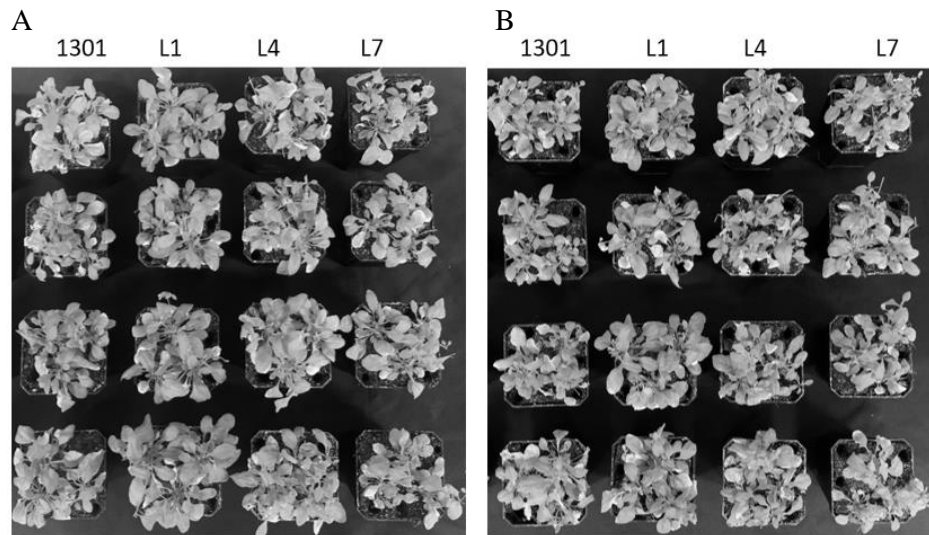
图3 *Zm00001eb009320* 转基因植株鉴定

Fig.3 Detection of *Zm00001eb009320* transgenic plant

2.3 转基因拟南芥对 *Pst*DC3000 病原菌的抗病实验

分别对 *Zm00001eb009320* 基因过表达株系的每个处理组(L1、L4 和 L7)和对照组(拟南芥转 1301a 空载株系),过表达拟南芥株系在接种 *Pst*DC3000 后的第 2、4、6 和 8 天进行记录观察。由表 2 病情指数结果可以看出,在接种后的第 2 天,对照组空载 1301a 的过表达拟南芥的病情指数为 8.15,同时期的

Zm00001eb009320 基因的每个处理组(L1、L4 和 L7)的病情指数分别为 8.01、3.33 和 6.45。在接种的第 8 天,处理组 L1、L4 和 L7 的病情指数分别为 31.00、20.98 和 31.13,也同样低于对照组 1301a。在接种的第 4 天和第 6 天,L1、L4 和 L7 植株的病情指数,也均低于对照组 1301a。以上结果表明,*Zm00001eb009320* 基因的过表达株系相对于对照,对 *Pst*DC3000 有更强的抵抗效果。



注:A为接种 *Pst*DC3000 的第 6 天;B为接种 *Pst*DC3000 的第 8 天。

Note: A, On the 6th day after inoculation of *Pst*DC3000; B, On the 8th day after inoculation of *Pst*DC3000.

图 4 *Zm00001eb009320* 接种 *Pst*DC3000 后不同时间段的发病情况

Fig.4 Incidence of *Zm00001eb009320* in different periods after inoculation of *Pst*DC3000

表 2 *Zm00001eb009320* 接种 *Pst*DC3000 后病情数

Table 2 Disease index of *Zm00001eb009320* after *Pst*DC3000 inoculated

处理组 Treatment group	接种病原菌后不同时间段处理组的病情指数 Disease index of treatment group at different time period after inoculation of pathogen							
	2 d		4 d		6 d		8 d	
	病情指数	防效(%) Control effect	病情指数	防效(%) Control effect	病情指数	防效(%) Control effect	病情指数	防效(%) Control effect
1301	8.15 a	—	21.07 a	—	25.95 a	—	34.72 a	—
L1	8.01 a	1.72	20.44 a	2.99	23.13 b	10.87	31.00 b	10.71
L4	3.33 c	59.15	10.22 b	51.50	10.09 c	61.12	20.98 c	39.57
L7	6.45 b	20.86	20.42 a	3.08	23.84 b	8.13	31.13 b	10.34

注:“—”为无防效;同列数据后的不同小写字母表示 0.05 水平上差异显著。

Note: —, No control effect; different letters indicate significant differences between treatments according to DPS's multiple range test ($P=0.05$).

Zm00001eb009320 转基因拟南芥接种 *Pst*DC3000 后的体内菌体数测定:病原菌会依靠拟南芥提供的养分快速生长和繁殖,*Zm00001eb009320* 过表达拟南芥植株对病原菌 *Pst*DC3000 入侵所呈现的抗病效果,进一步对其过表达植株与空载 1301a 过表达载体植株体内菌体含量进行测算。因此,过表

达 *Zm00001eb009320* 接种了 *Pst*DC3000 后的第 2 天和第 6 天,利用梯度稀释法对叶片内病原菌数量进行统计。过表达 *Zm00001eb009320* 接种了 *Pst*DC3000 后的第 2 天和第 6 天,菌体数的结果如图 5 所示。在接种的第 2 天,与 5.64×10^5 cfu/g 的 1301a 株系的菌体含量数相比,*Zm00001eb009320* 转基因拟

南芥 L1、L4 和 L7 叶片中的含菌数分别为 2.83×10^5 、 4.00×10^5 和 2.33×10^5 cfu/g。随着时间的推移(2~6 d),空载 1301a 和 *Zm00001eb009320* 基因过表达拟南芥植株菌体数都有显著的提高。在接种后的第 6 天, L1、L4 和 L7 的菌体含量数分别为 18.33×10^5 、 10×10^5

和 20×10^5 cfu/g,均低于空载 1301a 菌体数。结果表明,*Zm00001eb009320* 基因转入拟南芥后,能够抑制 *PstDC3000* 在拟南芥叶部的扩繁,进而提高拟南芥对 *PstDC3000* 的抗性。

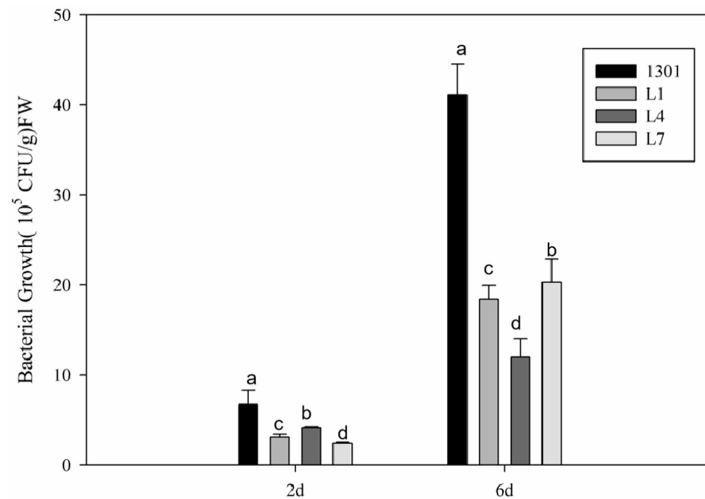


图5 *Zm00001eb009320* 接种 *PstDC3000* 后拟南芥叶片菌体数量

Fig.5 Content of bacteria of *Zm00001eb009320* in *Arabidopsis thaliana* leaves after *PstDC3000* inoculation

2.4 转 *Zm00001eb009320* 基因植株在病原菌 *PstDC3000* 胁迫下相关基因的表达分析

前期实验发现,基因 *Zm00001eb009320* 的过表达植株对病原菌的侵染具有一定的抵抗作用。因此,为进一步研究基因 *Zm00001eb009320* 的作用机

制,明确基因 *Zm00001eb009320* 过表达植株在其受到病原菌 *PstDC3000* 胁迫下所参与的信号通路。选取的拟南芥水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)和乙烯(ET)三大信号途径的 *PR1*、*PDF1.2* 和 *ERF1* 等关键标志基因来进行表达分析。

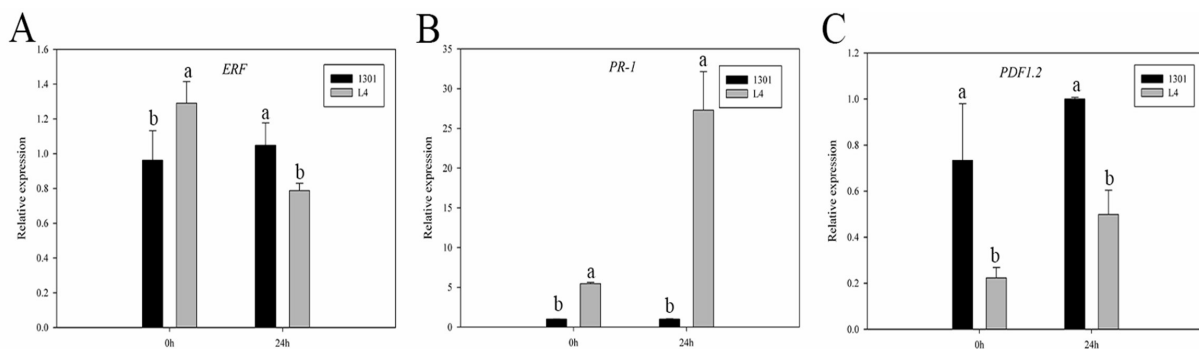


图6 *Zm00001eb009320* 转基因拟南芥中信号通路标志基因的表达分析

Fig.6 Expression analysis of marker genes in signaling pathway in *Zm00001eb009320* transgenic *Arabidopsis*

Zm00001eb009320 基因过表达株系的处理组 L4 和 WT 植株,在对受到病原菌 *PstDC3000* 侵入后的 0 h 和 24 h 的关键标志基因 *PDF1.2*、*ERF1* 和 *PR1* 进行荧光定量分析,结果如图 6 所示。在接种 *PstDC3000* 24 h 后,PDF1.2 表达量远低于 WT;ERF1 的表达量在接种 *PstDC3000* 24 h 略有下降;*PR1* 基因在过表达植株 L4 中 0 h 的 *PR1* 基因表达量是 WT 植株 0 h 表达量的 4.59 倍,24 h 的 *PR1* 基因表达量上升

为最高值,为 WT 中 *PR1* 基因表达量的 27 倍。上述结果表明,*Zm00001eb009320* 基因可能是通过激活拟南芥体内 SA 信号通路参与植物对 *PstDC3000* 的防御反应。

3 结论与讨论

植物在长期应对病原菌侵染时具有一套复杂的防御机制,用以接收和传导免疫信号并激发抗病反

应^[16]。植物模式识别受体(Plant Pattern Recognition Receptors, PRRs)是一类位于细胞质膜上的受体蛋白,能感知病原体入侵并触发寄主免疫响应,如活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)的爆发^[17-18]。细胞壁相关激酶(Wall-Associated Kinases, WAKs)和WAK类激酶(WAK-Like Kinases, WAKLs)构成一种新的植物PRRs类别,在植物抵御多种真菌病害过程中扮演着重要的角色^[19]。其具体的抗性分子机制目前仍然不甚清楚。

本研究对玉米自交系B73中的*Zm00001eb009320*基因进行了生物信息学分析,发现其属于WAK蛋白家族。选取*Zm00001eb009320*基因过表达拟南芥植株开展相关抗病功能分析,通过*Zm00001eb009320*转基因植株接种*PstDC3000*病原菌的抗病实验,发现*Zm00001eb009320*转基因植株对病原菌*PstDC3000*具有较好的抗病能力。目前,关于*Zm00001eb009320*基因的功能与抗病作用机制尚未见报道,但是根据其分别隶属的WAK蛋白家族报道的功能而言,WAK以多基因家族形式存在,其表达模式具有组织特异性,主要在叶、茎中表达,在功能上参与病原菌反应^[20-22]、细胞伸长调控^[23]、铝胁迫反应等^[24];WAK蛋白家族成员均可直接或间接参与和诱导植物体本身产生防御机制,对植物病原菌的侵入起到抵抗和杀灭的效果^[25]。在本次实验中发现,转*Zm00001eb009320*基因的植株在一定程度上增强植株的抗病能力,该结果与这些家族的抗病特性相一致。

本试验初步明晰了*Zm00001eb009320*基因在拟南芥中对*PstDC3000*病原菌的抗性及其作用途径,但如何参与信号通路、对其他病原菌是否也具有抗性等有待进一步研究。*Zm00001eb009320*作为玉米中的基因,其在玉米中的过表达是否存在抗病性还尚不清楚。本实验并未直接在玉米中过表达以验证*Zm00001eb009320*的抗病机制,对于*Zm00001eb009320*基因在玉米中的抗病机制仍需进一步验证。

参考文献:

- [1] WANG S, CHEN Z, TIAN L, et al. Comparative proteomics combined with analyses of transgenic plants reveal Zm REM 1.3 mediates maize resistance to southern corn rust[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(11): 2153-2168.
- [2] LUAN Q L, ZHU Y X, MA S, et al. Maize metacaspases modulate the defense response mediated by the NLR protein Rp1-D21 likely by affecting its subcellular localization[J]. *The Plant Journal*, 2021, 105(1): 151-166.
- [3] LIU M, LI Y J, ZHU Y X, et al. Maize nicotinate N-methyltransfer-

- ase interacts with the NLR protein Rp1-D21 and modulates the hypersensitive response[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2021, 22(5): 564-579.
- [4] LI Z, LI Z, JI Y, et al. The heat shock factor 20-HSF4-cellulose synthase A2 module regulates heat stress tolerance in maize[J]. *The Plant Cell*, 2024: koae106.
- [5] WANG Q, GUO Q, SHI Q, et al. Histological and single-nucleus transcriptome analyses reveal the specialized functions of ligular sclerenchyma cells and key regulators of leaf angle in maize[J]. *Molecular Plant*, 2024, 17(6): 920-934.
- [6] XIE J, FEI X, YAN Q, et al. The C₄ photosynthesis bifunctional enzymes, PDRPs, of maize are co-opted to cytoplasmic viral replication complexes to promote infection of a prevalent potyvirus sugarcane mosaic virus[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(7): 1812-1832.
- [7] 李晶,尹祥佳,王雅琳.转基因玉米培育及其检测技术应用研究[J]. *中国种业*, 2022(8): 27-30.
LI J, YIN X J, WANG Y L. Research on the cultivation of genetically modified maize and the application of detection technologies[J]. *China Seed Industry*, 2022(8): 27-30. (in Chinese)
- [8] ZHONG T, ZHU M, ZHANG Q, et al. The ZmWAKL-ZmWIK-ZmBLK1-ZmRBOH4 module provides quantitative resistance to gray leaf spot in maize[J]. *Nature Genetics*, 2024: 1-12.
- [9] WANG D, QIN L, WU M, et al. Identification and characterization of WAK gene family in *Saccharum* and the negative roles of ScWAK1 under the pathogen stress[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 224: 1-19.
- [10] 王其,陈小洁,顾双月,等.杜仲内生拮抗细菌DZSY21诱导玉米抗病基因表达变化的转录组学研究[J]. *浙江农业学报*, 2019, 31(3): 345-354.
WANG Q, CHEN X J, GU S Y, et al. Transcriptome profiling of maize resistance gene in response to DZSY21 induction[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2019, 31(3): 345-354. (in Chinese)
- [11] DING T, SU B, CHEN X, et al. An endophytic bacterial strain isolated from *Eucommia ulmoides* inhibits southern corn leaf blight[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 903.
- [12] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. 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.
- [13] ZHENG X, XING J, ZHANG K, et al. Ethylene response factor ERF11 activates BT4 transcription to regulate immunity to *Pseudomonas syringae*[J]. *Plant Physiology*, 2019, 180(2): 1132-1151.
- [14] LI T, HUANG Y, XU Z S, et al. Salicylic acid-induced differential resistance to the tomato yellow leaf curl virus among resistant and susceptible tomato cultivars[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19: 1-14.
- [15] RAYAPURAM C, BALDWIN I T. Increased SA in NPR1-silenced plants antagonizes JA and JA-dependent direct and indirect defenses in herbivore-attacked *Nicotiana attenuata* in nature[J]. *The Plant Journal*, 2007, 52(4): 700-715.
- [16] HUANG J, GU M, LAI Z, et al. Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(4): 1526-1538.

- [17] AU K Y, SHI W W, QIAN S, et al. Improvement of the pharmacological properties of maize rip by cysteine-specific pegylation[J]. *Toxins*, 2016, 8(10): 298.
- [18] TIAN H, ZHANG Y. The emergence of a mobile signal for systemic acquired resistance[Z]. *American Society of Plant Biologists*. 2019: 1414–1415
- [19] LI N, HAN X, FENG D, et al. Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/jasmonate in plant defense: Do we understand what they are whispering?[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(3): 671.
- [20] ARORA R, KUMAR A, SINGH I K, et al. Pathogenesis related proteins: A defensin for plants but an allergen for humans[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 157: 659–672.
- [21] CARVALHAIS L C, DENNIS P G, BADRI D V, et al. Activation of the jasmonic acid plant defence pathway alters the composition of rhizosphere bacterial communities[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56457.
- [22] CHEN Z, ZHENG Z, HUANG J, et al. Biosynthesis of salicylic acid in plants[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2009, 4(6): 493–496.
- [23] DI X, GOMILA J, TAKKEN F L. Involvement of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling pathways in the susceptibility of tomato to *Fusarium oxysporum*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2017, 18(7): 1024–1035.
- [24] PIETERSE C M, VAN DER DOES D, ZAMILOUDIS C, et al. Hormonal modulation of plant immunity[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2012, 28: 489–521.
- [25] SEYFFERTH C, TSUDA K. Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 697.

(责任编辑:朴红梅)