

苦荞基因 *FtAPDSLX1* 的克隆及其抗立枯病功能分析

杨智敏^{1,2}, 彭晓杨^{1,2}, 黄旭², 焦茹玉¹, 李伟², 关超男^{2,3}, 周美亮², 严明理¹, 肖璐¹

(¹湖南科技大学生命科学与健康学院, 湘潭 411201; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ³海南省种业实验室, 三亚 572000)

摘要: 苦荞 (*Fagopyrum tataricum*) 是蓼科荞麦属的一年生草本植物, 是一种药食同源的优质作物。荞麦立枯病的发生严重影响苦荞种植的推广与发展。本研究对茉莉酸或水杨酸处理后的苦荞进行转录组分析, 发现天冬氨酸蛋白酶基因 *FtAPDSLX1* 的表达模式受到茉莉酸或水杨酸的诱导。对不同抗性水平苦荞中的 *FtAPDSLX1* 表达量分析结果显示, 立枯丝核菌抗性材料中 *FtAPDSLX1* 的表达量显著高于立枯丝核菌易感材料。以苦荞代表性品种川荞一号为材料, 克隆得到 *FtAPDSLX1* 基因。生物信息学分析结果显示, *FtAPDSLX1* 基因的 CDS 序列中包含 1143 个碱基对, 编码 380 个氨基酸构成的蛋白质, 该基因启动子具有多个与抗病相关的顺式元件。对 *FtAPDSLX1* 的表达模式进行分析发现, 苦荞幼苗中的 *FtAPDSLX1* 基因表达量受到立枯丝核菌侵染的诱导, 且具有显著的组织特异性。对转 *FtAPDSLX1* 基因拟南芥株系进行抗病表型分析, 结果表明 *FtAPDSLX1* 提高了转基因拟南芥的立枯丝核菌抗性, 同时病菌胁迫下转基因拟南芥中 *FtAPDSLX1* 的表达量显著提高, 并且 *FtAPDSLX1* 提高了转基因拟南芥中超氧化物歧化酶、过氧化物酶的酶活性。以上结果显示, 苦荞受到立枯丝核菌侵染时, *FtAPDSLX1* 可能参与了对立枯丝核菌的防御机制。*FtAPDSLX1* 的功能验证及相关研究为苦荞抗立枯丝核菌的分子机制解析以及抗病种质资源的筛选奠定了工作基础。

关键词: *FtAPDSLX1*; 天冬氨酸蛋白酶; 立枯丝核菌; 过表达; 拟南芥

Cloning of the *FtAPDSLX1* Gene in Tartary Buckwheat and Analysis of Its Anti-*Rhizoctonia solani* Function

YANG Zhimin^{1,2}, PENG Xiaoyang^{1,2}, HUANG Xu², JIAO Ruyun¹, LI Wei²,
GUAN Chaonan^{2,3}, ZHOU Meiliang², YAN Mingli¹, XIAO Lu¹

(¹College of Life Science and Health, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201; ²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ³Hainan Provincial Seed Industry Laboratory, Sanya 572000)

Abstract: Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*), a member of the *Fagopyrum* genus of the Polygonaceae family, is an annual herbaceous plant known for its medicine and edible qualities. The occurrence of *Fagopyrum* damping-off has seriously affected the promotion and development of tartary buckwheat cultivation. This study conducted transcriptome analysis on tartary buckwheat treated with jasmonic acid or salicylic acid, revealing that the transcription of the aspartic protease gene *FtAPDSLX1* was inducible. Through analyzing gene expression in genotypes showing levels of resistance, significantly higher transcripts of *FtAPDSLX1* were detected in resistant line if compared to susceptible ones. Using the representative variety Chuanqiao No. 1 as material, the *FtAPDSLX1* gene was cloned with the full-length coding sequence of 1143 base pairs. This gene encodes 380 amino acids, and its promoter contains multiple cis-elements associating with disease resistance. *FtAPDSLX1* was up-regulated in the seedlings upon *Rhizoctonia solani* invasion and its expression exhibited significant tissue specificity. Disease resistance analysis of *Arabidopsis* plants

收稿日期: 2024-04-10 网络出版日期: 2024-11-11

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240410001>

第一作者研究方向为荞麦品质抗逆, E-mail: 154193899@qq.com; 彭晓杨为共同第一作者

通信作者: 严明理, 研究方向为作物遗传育种, E-mail: mlyan@hunaas.cn

肖璐, 研究方向为微生物资源学, E-mail: xiaolu65218@sina.com

基金项目: 国家自然科学基金(32301813)

Foundation project: National Natural Science Foundation of China (32301813)

overexpressing *FtAPDSLX1* indicated that *FtAPDSLX1* led to enhanced resistance against *Rhizoctonia solani* and. Overexpressing *FtAPDSLX1* resulted in elevated enzymatic activities of SOD and POD. These results suggest that *FtAPDSLX1* may participate in the defense against *Rhizoctonia solani* in tartary buckwheat. The functional validation of *FtAPDSLX1* and related studies provided a foundation for unraveling the molecular mechanisms underlying *Fagopyrum tataricum*'s resistance to *Rhizoctonia solani* for screening disease-resistant germplasm resources.

Key words: *FtAPDSLX1*; aspartic protease; *Rhizoctonia solani*; overexpression; *Arabidopsis thaliana*

荞麦 (*Fagopyrum Mill*) 为蓼科 (Polygonaceae) 荞麦属 (*Fagopyrum*) 的一年生或多年生草本或半灌木植物, 在中国西南部、中国北部、欧洲、俄罗斯、尼泊尔和不丹等高海拔地区, 被当地居民用作主食^[1]。荞麦能提供人体所必需的氨基酸、淀粉等有机物质, 同时芦丁、槲皮素和表儿茶素等黄酮类物质含量极高, 对糖尿病、高血压和高脂血症有治疗作用^[2-3]。苦荞富含具有杀菌、消炎、抗氧化等功能的类黄酮物质, 被誉为“五谷之王”, 是荞麦的主要栽培种之一, 在我国具有悠久的栽培历史^[4]。随着健康饮食的观念深入人心, 苦荞作为健康主食和功能性食品生产的重要原材料, 在我国四川、云南、贵州及西藏等地区的种植规模逐渐扩大^[5]。

荞麦病害不仅会降低荞麦本身营养成分, 同时会导致荞麦大规模减产。荞麦病害具有发病种类多、患病影响大的特点, 到目前为止, 国内外报道的荞麦病害共 19 种, 共分为 14 种真菌病害、5 种其他病害^[6]。荞麦立枯病已经成为世界上农业经济生产中最严重的自然病害之一^[7], 是由立枯丝核菌侵害引起的^[8], 使用传统杀菌手段不仅不能对立枯丝核菌的防治起到有效作用, 同时还会导致各种土壤问题且对生态环境造成极大的破坏。荞麦种质本身的抗病性与荞麦立枯丝核菌抗性密切相关, 筛选对荞麦立枯丝核菌具有高抗性的作物资源以及发掘抗立枯病的基因是荞麦种质资源工作的重要环节^[9]。金荞麦 (*F. cymosum*) 被认为是苦荞的原始类型与野生祖先, 对于流行的荞麦病害具有更强的抗病性^[10], 常用于与苦荞进行杂交以培育优质种质。

茉莉酸 (JA, jasmonic acid) 是响应植物逆境胁迫的重要激素^[11], 茉莉酸甲酯 (MeJA, methyl jasmonate) 可正向调控超氧化物歧化酶 (SOD, superoxide dismutase)、过氧化物酶 (POD, peroxidase) 等相关防御抗性酶的活性^[12], 同时抑制一系列脱氢酶的活性, 以此达到提高相关抗性基因表达的目的, 从而提高植物对病害侵染的抵抗能力。水杨酸 (SA,

salicylic acid) 及其受体蛋白 NPR1 介导的水杨酸信号通路参与了植物免疫, 对维持植物基础抗性和建立系统获得抗性具有重要意义, 并且一定程度上具有广谱的抗病功能^[13-14]。实验室前期结合多组学分析揭示了茉莉酸介导的苦荞立枯病抗性的分子机制, 定位到一个天冬氨酸蛋白酶基因 (*FtASP*), 该基因具有抗菌肽功能, 可以减缓真菌的生长^[15]。因此推测同为天冬氨酸蛋白酶基因的 *FtAPDSLX1* 在苦荞中可能具有抗病相关功能。

本研究以栽培种苦荞种质川荞 1 号为试验材料进行 PCR 扩增, 克隆得到 *FtAPDSLX1*, 并对其理化性质和生理功能进行了深入探索。通过亚细胞定位技术, 观察 *FtAPDSLX1* 在细胞中的分布情况。通过荧光定量 PCR 对 *FtAPDSLX1* 在苦荞中的表达模式进行分析。构建 *FtAPDSLX1* 转基因拟南芥对其立枯丝核菌抗性进行鉴定。对该基因的深入研究不仅对解析苦荞抗立枯丝核菌的分子机制具有重要作用, 同时为栽培种苦荞抗病种质筛选提供了理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

本研究所使用的苦荞种质资源 (NPL324、GS181、GZ269、HB93、SX122、SX96、HB384、YN306、QH361、GS194 以及川荞 1 号)、立枯丝核菌菌株 (*Rhizoctonia solani* AG4-HGI3)、感受态细胞 (DH5 α 、GV3101)、核定位细胞以及载体 (pCAMBIA1307、pCAMBIA1305) 等均由中国农业科学院作物科学研究所荞麦基因资源组提供。

1.2 苦荞总 RNA 的提取以及反转录

选取健康饱满的川荞一号荞麦种子, 于 2023 年在室温为 28 $^{\circ}$ C, 相对湿度为 75%~80%, 光照 16 h/黑暗 8 h 的环境下培养一周, 并选取长势正常的 50~100 mg 苦荞幼苗, 利用 RNAprep Pure Plant Kit 试剂盒 (天根生化科技有限公司, 北京) 提取幼苗 RNA, 进行吸光值检测和琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 用

FastKing One Step RT-PCR Kit 试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)反转录为cDNA,并于-20℃保存备用。

1.3 转录组测序

选用颗粒饱满且大小均匀的种子,剥去种皮后,用75%乙醇浸泡清洗5 min,然后在10%次氯酸钠浸泡15 min 杀菌消毒,最后使用无菌水反复清洗数次,吹干水分后将其均匀铺种于MS培养基上,于28℃、相对湿度75%~80%、光照16 h/黑暗8 h环境下的组培间中培养。将发育良好的无菌苗整株放入分别加有1 mmol/L水杨酸和50 μmol/L茉莉酸的MS液体培养基中,于28℃摇床中培育,分别于0 h、1 h、4 h和12 h进行整株幼苗取样,并立即用液氮速冻,随后送至北京安诺优达基因科技有限公司转录组测序。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence (5' -3')	用途 Function
<i>FtAPDSLX1</i> -F	ATGGCGGAGGCAATCACGA	基因克隆
<i>FtAPDSLX1</i> -R	TTAGTAGAGTGGCCCAATG	
<i>1307-FtAPDSLX1</i> -F	GACTTGAAGCTCGGTATCTAGAATGGCGGAGGCAATCACGA	构建过表达载体
<i>1307-FtAPDSLX1</i> -R	CTTGATATCGAATTCCTGCAGTTAGTAGAGTGGCCCAATG	
<i>1307</i> -F	CTCAAGCAATCAAGCATTCTAC	1307通用引物
<i>1307</i> -R	GAGAGACTGGTGATTTTTGCG	
<i>FtH3</i> -qPCR-F	GAAATTCGCAAGTACCAGAAGAG	qRT-PCR 苦荞内参基因
<i>FtH3</i> -qPCR-R	CCAACAAGGTATGCCTCAGC	
<i>Actin7</i> -qPCR-F	TCCATGAAACAACCTACAACCTCCATCA	qRT-PCR 拟南芥内参基因
<i>Actin7</i> -qPCR-R	CATCGTACTCACTCTTTGAAATCCACA	
qPCR- <i>FtAPDSLX1</i> -F	GAAGCACCCAACCTCAAGCATAGCT	qRT-PCR
qPCR- <i>FtAPDSLX1</i> -R	ACCCTTTCCCGAGGCACTCA	
<i>1305-FtAPDSLX1</i> -F	CGGAGCTAGCTCTAGAATGGCGGAGGCAATCACGA	亚细胞定位载体引物
<i>1305-FtAPDSLX1</i> -R	TGCTCACCATGGATCCTTAGTAGAGTGGCCCAATG	

在荞麦基因组和表型数据库网站(<http://47.93.16.146/>)查询得到*FtAPDSLX1* CDS序列,运用ExPASy网站(<https://web.expasy.org/protparam/>)查询*FtAPDSLX1*蛋白理化性质,用PHYRE2(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)网站查询*FtAPDSLX1*蛋白二级结构并使用Swiss Model(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)对其三级结构进行作图。使用PLANTCARE网站(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对*FtAPDSLX1*基因启动子序列进行分析,通过UNIPROT在线网站(<https://www.uniprot.org/blast/>)

1.4 苦荞 *FtAPDSLX1* 基因的克隆与生物信息学分析

使用SnapGene软件设计CDS的全长扩增引物(表1),并利用PCR扩增得到*FtAPDSLX1*基因全长CDS。PCR反应总体系为50 μL: 2×Phanta Max Master Mix 25 μL、正反向引物各2 μL、cDNA模板1 μL(200 ng/μL)、ddH₂O补充至50 μL。反应条件为94℃预变性2 min; 95℃变性30 s, 58℃退火60 s, 72℃延伸1 min, 30个循环;最后72℃延伸7 min。通过琼脂糖凝胶电泳将PCR扩增产物分离,对正确条带进行回收和产物纯化。利用纯化产物进行T载体连接,并转化至大肠杆菌DH5α感受态细胞。转化好的感受态细胞均匀涂抹在带有AMP抗性的LB固体培养基上,37℃过夜培养,次日挑选单菌落,PCR鉴定并测序,得到包含*FtAPDSLX1*基因的质粒。

uniprotkb/)将*FtAPDSLX1*蛋白序列与不同物种进行比对,并使用MEGA11软件进行系统发育树的绘制。

1.5 苦荞 *FtAPDSLX1* 基因的表达分析

1.5.1 不同抗病水平苦荞种质中 *FtAPDSLX1* 基因的表达量 选择5份对立枯丝核菌具有抗性的材料NPL324、GS181、GZ269、HB93、SX122以及5份对立枯丝核菌表现为易感的材料SX96、HB384、YN306、QH361、GS194在室温为28℃、相对湿度为75%~80%、光照16 h/黑暗8 h的环境下培养一周后,选取长势正常的整株幼苗进行RNA提取以及反转

录。利用 SnapGene 软件设计候选基因 *FtAPDSLX1* 的荧光定量引物对 qPCR-*FtAPDSLX1*-F/R (表 1)。以上述材料的 cDNA 为模板进行 *FtAPDSLX1* 在不同抗病等级苦荞种质的表达量分析。采用 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 荧光定量试剂盒 (诺唯赞生物技术有限公司, 南京) 和 7500 Real Time PCR System 仪器以及 qRT-PCR 苦荞内参基因引物与 qPCR-*FtAPDSLX1* 引物进行 qRT-PCR 检测和分析 (表 1)。相对表达量计算使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。反应体系: 正反向引物各 1 μ L, cDNA 模板 1 μ L (200 ng/ μ L), SYBR10 μ L, 加入 7 μ L ddH₂O 补充至 20 μ L。反应条件: 在 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 而后进入循环扩增阶段: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.5.2 苦荞 *FtAPDSLX1* 基因的表达分析 用立枯丝核菌菌液浸泡培育 3 周后长势良好的整株苦荞麦川荞 1 号无菌苗, 分为 4 组, 每组 3 株, 于 28 $^{\circ}$ C 环境下培养 0 h、6 h、12 h、24 h 后分别对叶、茎、根进行取样, 并提取总 RNA, 以测定 *FtAPDSLX1* 基因在苦荞不同组织中的相对表达量, 方法同 1.5.1。

将 *FtAPDSLX1* 转基因拟南芥株系 (*OE1*、*OE2*、*OE3*) 和野生型拟南芥 (WT) 在室温为 28 $^{\circ}$ C、相对湿度为 75%~80%、光照 16 h/黑暗 8 h 的环境下培养 3 周。同一花盆中种植 4 株拟南芥为一组, 分别为 *OE1*、*OE2*、*OE3*、WT, 共种植 12 盆 48 株苗。利用立枯丝核菌侵染以上所有的拟南芥 (方法同上), 分别在 0 h、6 h、12 h、24 h 四个不同时间段取样, 每个时段分别取 3 盆, 即为 3 次生物学重复。将所得到的样品进行 RNA 提取并进行反转录得到 cDNA, 利用 qRT-PCR 方法对不同侵染时间段下的野生型拟南芥 (WT) 和 *FtAPDSLX1* 转基因拟南芥株系的相对表达量进行分析, 方法同 1.5.1。

1.5.3 实时荧光定量 PCR 利用 SnapGene 软件根据 *FtAPDSLX1* 基因的非保守区间, 设计荧光定量引物对 *FtAPDSLX1*-qPCR-F/R, 荞麦组成型表达基因 *FtH3* 作为内参基因 (表 1), 采用荧光定量试剂盒和实时荧光定量 PCR 仪器进行 qRT-PCR 检测和分析。

1.6 亚细胞定位融合载体的构建

利用亚细胞定位引物 1305-*FTAPDSLX1*-F/R, 以反转录得到的川荞一号 cDNA 为底物 (反应体系及反应条件见 1.4), 构建亚细胞定位融合载体 pCAMBIA1305-*FtAPDSLX1*-GFP。以 1305-GFP 空载体采用农杆菌介导法通过注射使其瞬时共转化

到本氏烟草叶片背面作为对照组, 亚细胞定位融合载体 pCAMBIA1305-*FtAPDSLX1*-GFP 瞬时共转化到本氏烟草叶片背面作为试验组, 试验组与对照组中均加入含有核定位序列 (NLS, nuclear localization signal) 的农杆菌菌液作为核 marker, 避光培养 12 h 后, 置于正常条件下培养 48 h。使用激光共聚焦显微镜进行观察。

1.7 植物过表达载体的构建及拟南芥的遗传转化

1.7.1 pCAMBIA1307-*FtAPDSLX1* 过表达载体的构建 利用测序比对正确的 *FtAPDSLX1* 菌液提取目的质粒, 依据 pCAMBIA1307 图谱和酶切位点 *Bam*HI 和 *Kpn*I 设计引物 1307-*FtAPDSLX1*-F/R (表 1) 进行 PCR 反应扩增, 利用 1% 琼脂糖核酸凝胶对 PCR 产物进行检测, 选取正确条带并进行胶回收, 与经过双酶切的回收 pCAMBIA1307 进行同源重组, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经培养后选取单菌落进行培养, 得到菌液后使用 1307 通用引物 (表 1) 进行 PCR 鉴定以及测序比对后得到的 *FtAPDSLX1*-1307 过表达载体菌株, 用甘油于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。PCR 体系和程序同 1.4。

1.7.2 转化农杆菌 GV3101 及侵染拟南芥 提取 pCAMBIA1307-*FtAPDSLX1* 质粒, 并利用检测合格的重组质粒转化农杆菌 GV3101 感受态细胞, 经过培养并进行鉴定后得到 *FtAPDSLX1* 阳性农杆菌菌液。利用阳性农杆菌菌液制备拟南芥侵染工作液, 使用蘸花法对抽苔的野生型拟南芥的花蕾进行侵染, 收种后得到 *FtAPDSLX1* 转基因拟南芥 T0 代种子, 进行发苗筛选后得到 T1 代转基因拟南芥。选取 T1 代幼苗的叶片作为样品进行基因组 DNA 提取, 并对得到的基因组 DNA 进行鉴定, 检测后获得 *FtAPDSLX1* 转基因植株 *OE1*、*OE2*、*OE3*。

1.8 *FtAPDSLX1* 转基因拟南芥的病菌侵染分析

将 *FtAPDSLX1* 转基因株系 *OE1*、*OE2*、*OE3* 种子和野生型对照 WT 种子经无水乙醇消毒干燥后均匀撒在 MS 固体营养板上。大概 3 周后, 将长出真叶的 *FtAPDSLX1* 转基因株系和 WT 的幼苗移植于花盆中, 并在室温 22 $^{\circ}$ C、相对湿度为 75%~80%、16 h 光照/8 h 黑暗的环境下进行培养, 得到 *FtAPDSLX1* 转基因株系和 WT 拟南芥, 选取 *FtAPDSLX1* 转基因株系和 WT 的离体叶片作为样品进行表型分析。将储存的立枯丝核菌菌株活化后涂布于 PDB 培养基上进行培养, 得到活力较高的立枯丝核菌菌板。选取 *FtAPDSLX1* 转基因株系和 WT 的离体叶片各 18 片分别置于培养皿中, 并在叶片下垫入湿润的滤纸以

保持叶片湿度,将叶片均分为两组,试验组利用大小一致、活性正常的立枯丝核菌饼对离体叶片表面进行接种,以观察 *FtAPDSLXI* 转基因株系和野生型 WT 病菌侵染下的发病情况,对照组为立枯丝核菌菌块接种 0 h。将培养皿利用封口膜进行封闭保湿处理后,于 28 °C 环境下暗培养 24 h 后观察试验组与对照组的发病情况,并对 *FtAPDSLXI* 转基因株系和野生型 WT 的发病率及病斑面积占比进行统计,发病率=叶片发病数/叶片总数。利用 DAB 染色液对处理过后的 *FtAPDSLXI* 转基因株系和 WT 的离体叶片进行染色以进一步观察病斑情况。为了验证转基因拟南芥与野生型拟南芥的抗病性差异是否与 *FtADSLXI* 的表达量相关,通过 qRT-PCR 对立枯丝核菌侵染 0 h、6 h、12 h、24 h 的野生型拟南芥 WT 和转基因拟南芥株系 *OE1*、*OE2*、*OE3* 进行 *FtAPDSLXI* 表达模式测定。为了进一步确定转基因拟南芥的抗性是否显著提高,对转基因拟南芥与野生型拟南芥中的超氧化物歧化酶活性、过氧化物酶活性、丙二醛含量进行检测。对

野生型拟南芥和转基因拟南芥均进行 24 h 立枯丝核菌侵染处理,对照组为立枯丝核菌侵染 0 h。各组取样 9 株,利用北京索莱宝科技有限公司 POD 活性检测试剂盒、SOD 活性检测试剂盒以及 MDA 含量检测试剂盒进行抗病相关指标检测。

2 结果与分析

2.1 *FtAPDSLXI* 对苦荞抗立枯丝核菌的调控作用

2.1.1 水杨酸和茉莉酸诱导 *FtAPDSLXI* 的表达
转录组分析结果显示,苦荞中的 *FtAPDSLXI* 于茉莉酸处理 1 h 后表达量达到最大值(图 1A)。而在水杨酸处理的苦荞中, *FtAPDSLXI* 在 4 h 时表达量达到最大值(图 1B),且 12 h 时 *FtAPDSLXI* 表达量与 4 h 一致。前人研究表明,在葡萄抗病研究中,茉莉酸在抗白腐过程中发挥作用,而水杨酸在抗白粉病过程中诱导相关抗性基因表达^[16-17]。推测 *FtAPDSLXI* 可能参与茉莉酸或水杨酸介导的苦荞对立枯丝核菌的防御机制。

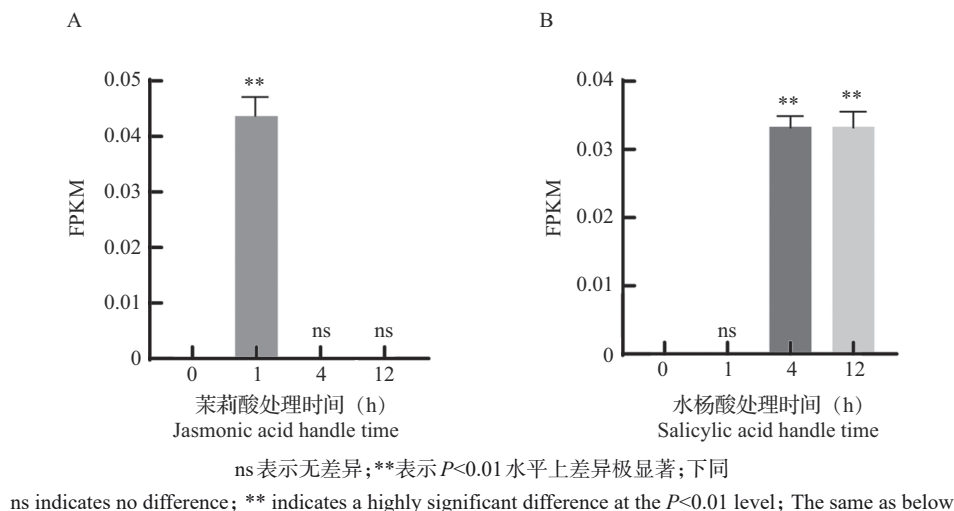


图1 茉莉酸/水杨酸处理后苦荞中 *FtAPDSLXI* 转录分析

Fig. 1 Transcriptome analysis of *FtAPDSLXI* in tartary buckwheat after JA/SA treatment

2.1.2 *FtAPDSLXI* 在不同抗病材料中的表达 为了检验 *FtAPDSLXI* 在不同抗性水平材料中的表达量是否存在差异,通过 qRT-PCR 对立枯丝核菌抗性材料与易感材料中的 *FtAPDSLXI* 表达量进行分析(图 2),结果显示在立枯丝核菌抗性种质 NPL324、GS181、GZ269、HB93、SX122 中 *FtAPDSLXI* 表达量均显著高于立枯丝核菌易感种质 SX96、HB384、YN306、QH361、GS194。进一步

表明了 *FtAPDSLXI* 与苦荞对立枯丝核菌的抗性具有紧密联系。

2.2 苦荞 *FtAPDSLXI* 的克隆与生物信息学分析

PCR 扩增得到 *FtAPDSLXI* 基因全长 CDS,通过琼脂糖凝胶电泳将 PCR 扩增产物分离。根据图 3 显示,2号泳道中分离得到的条带大小大约为 1000 bp,而 *FtAPDSLXI* 基因 CDS 为 1143 bp,将产物进行测序比对,结果证明该条带即是目的基因。

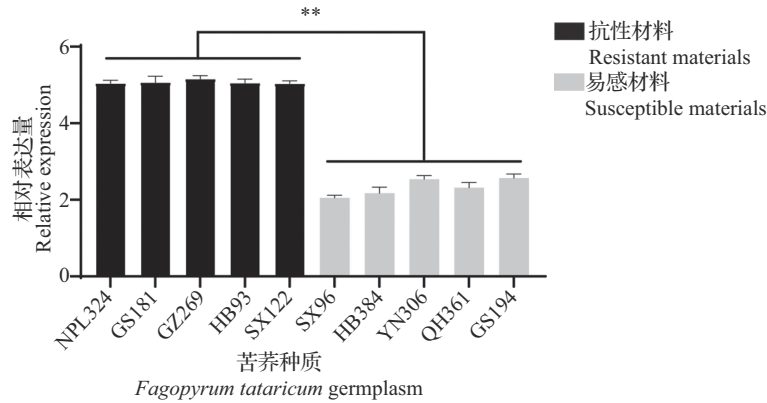
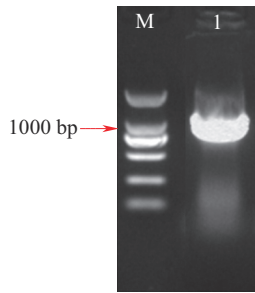


图2 *FtAPDSLX1* 在不同抗病等级苦荞种质中的表达模式

Fig. 2 Expression pattern of *FtAPDSLX1* in tartary buckwheat germplasm with different disease resistance grades



1: 目的条带

M: DL 2000 maker; 1: Target band

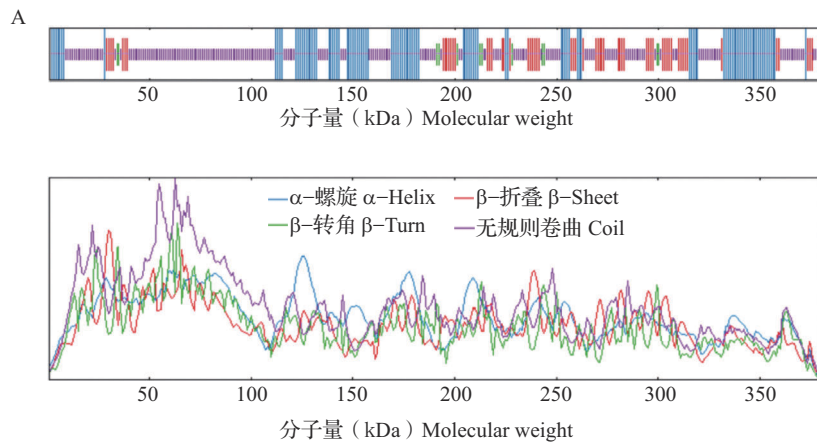
图3 *FtAPDSLX1* 基因 PCR 产物电泳结果

Fig. 3 Electrophoresis results of PCR products of *FtAPDSLX1* gene

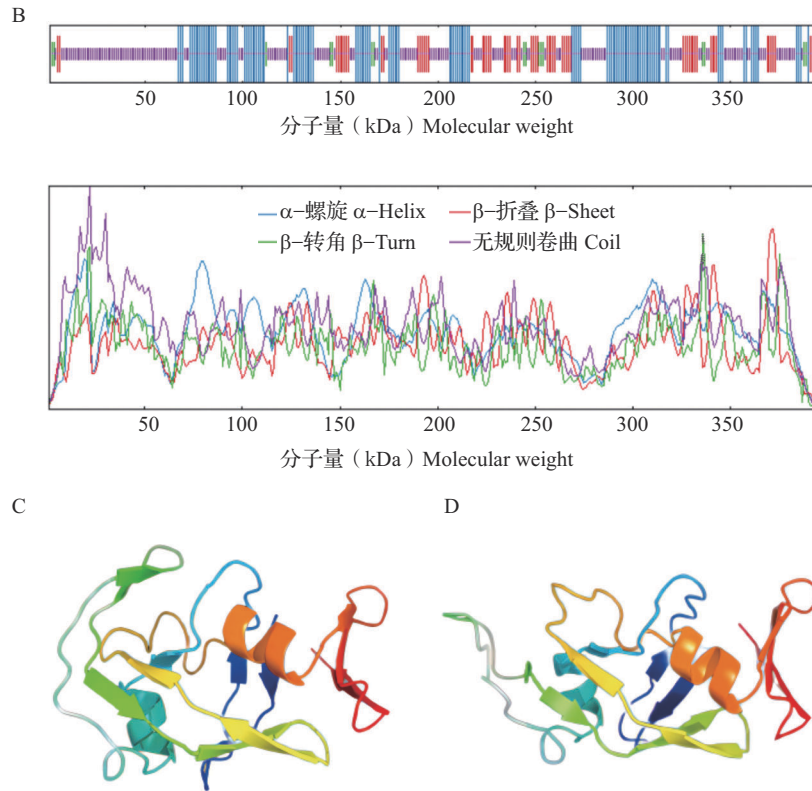
生物信息学分析得到 *FtAPDSLX1* 基因及其编码蛋白的详细信息。*FtAPDSLX1* 基因的 CDS 序列长度为 1143 bp (1143 碱基对), 编码了 380 个氨基酸构成的蛋白质。对 *FtAPDSLX1* 蛋白的性质进行分析, 结果表明其理论相对分子量约为 42.33 kDa; 等电点 (pI) 描述蛋白质在特定 pH 条件下的电荷状态, *FtAPDSLX1* 蛋白的理论等电点为 5.50; 蛋白的稳定性可以通过不稳定指数来评估, 通常不稳定指数大

于 40 时, 表示蛋白是不稳定的, *FtAPDSLX1* 蛋白的不稳定指数为 53.32, 是一个不稳定蛋白; 亲水性/疏水性分析是评估蛋白质在水环境中溶解性的重要步骤, *FtAPDSLX1* 蛋白亲水性为 -0.352, 是亲水性蛋白。

FtAPDSLX1 蛋白的二级结构主要由 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲组成, 分别占比 27.89%、15.53%、3.16% 和 53.42% (图 4A)。基于金荞较苦荞具有更强的抗病性, 因此在金荞中通过氨基酸序列比对得到 *FtAPDSLX1* 蛋白的同源蛋白 FD07G01375 并对其二级结构进行预测 (图 4B), FD07G01375 蛋白二级结构由 30.36% α -螺旋, 16.96% β -折叠, 4.05% β -转角以及 48.35% 无规则卷曲组成。FD07G01375 蛋白相较于 *FtAPDSLX1* 蛋白在二级结构上具有更多的 α -螺旋以及 β -转角。通过三级结构模型作图 (图 4C、D), 结果与二级结构大体一致。对 *FtAPDSLX1* 蛋白与 FD07G01375 蛋白保守结构域进行分析, 结果显示 *FtAPDSLX1* 蛋白的天冬氨酸蛋白酶结构域与 FD07G01375 蛋白之间存在差异, 可能导致金荞与苦荞之间抗病性的不同。



(图 4)



A、B 分别为 FtAPDSLX 和 FD07G01375 蛋白的二级结构；C、D 分别为 FtAPDSLX 和 FD07G01375 蛋白的三级结构
 A, B are the secondary structures of FtAPDSLX, FD07G01375 proteins, respectively; C, D are the tertiary structures of FtAPDSLX, FD07G01375 proteins, respectively

图4 FtAPDSLX1 同源蛋白结构比对

Fig. 4 Structural alignment of FtAPDSLX1 homologous proteins

对 *FtAPDSLX1* 基因上游序列进行分析,结果显示在 *FtAPDSLX1* 基因启动子中除了存在一系列激素响应元件如生长素响应元件 TGA-element、赤霉素响应元件 P-box、脱落酸应答顺式元件 ABRE 外,

还存在 G-box、MYB 和 MYC 等与抗逆相关的顺式作用元件以及病原菌诱导响应元件(图5,表2)。进一步推测 *FtAPDSLX1* 在苦荞中具有一定的抗病性。

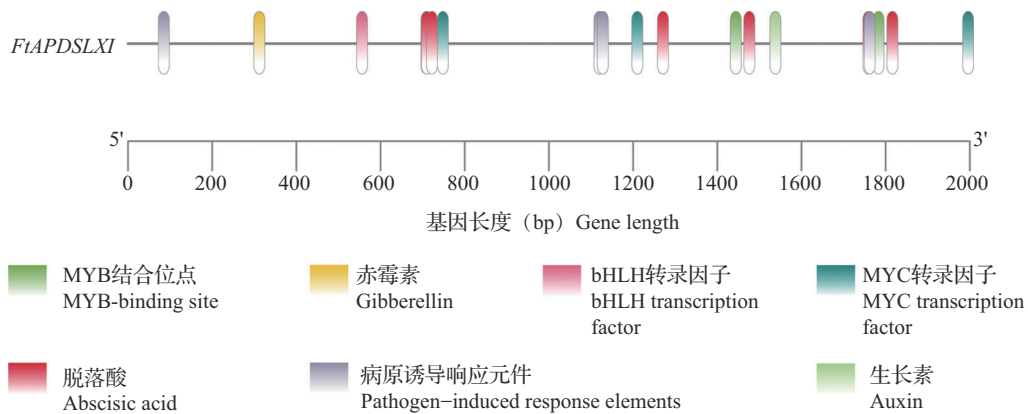


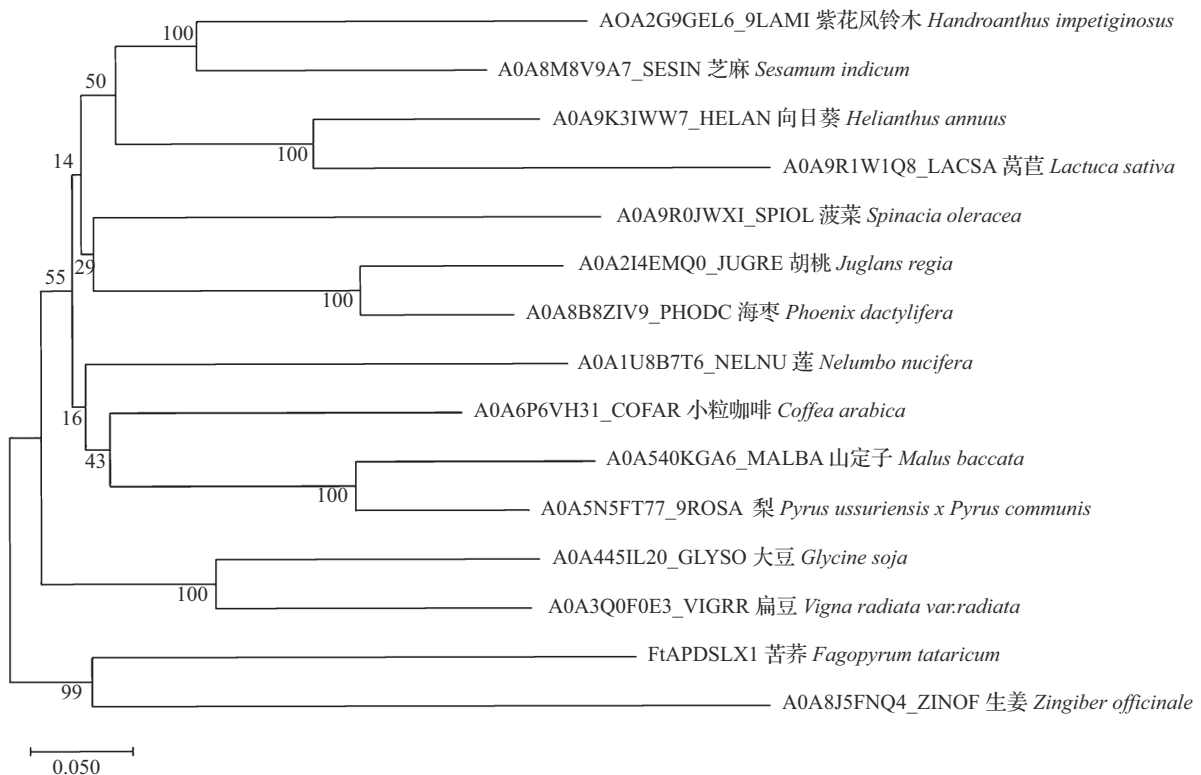
图5 *FtAPDSLX1* 启动子结构
 Fig. 5 The structure of *FtAPDSLX1* promoter

表 2 *FtAPDSLX1* 基因启动子顺式作用元件Table 2 Cis-elements in *FtAPDSLX1* gene promoter

位点名称 Site name	位点功能 Function of site	元件数量 Quantity of element
MYB	Anti stress related	6
TGA-element	Auxin-responsive element	1
ABRE	A cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness	7
O2-site	Cis-acting regulatory element involved in zein metabolism regulation	5
P-box	Gibberellin-responsive element	1
Sp1	Light responsive element	5
MYB-binding site	Anti stress related	3
ARE	Regulatory element essential for the anaerobic induction	2
GC-motif	Element involved in anoxic specific inducibility	2
G-box	A cis-acting regulatory element involved in light responsiveness	3
Box 4	A part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	1

为了解 *FtAPDSLX1* 蛋白在物种中的亲缘关系, 通过 UNIPROT 在线网站检索 *FtAPDSLX1* 蛋白序列, 发现小粒咖啡 (*Coffea arabica*)、大豆 (*Glycine soja*)、向日葵 (*Helianthus annuus*)、胡桃 (*Juglans regia*)、莴苣 (*Lactuca sativa*)、苹果属植物山定子 (*Malus baccata*)、莲 (*Nelumbo nucifera*)、海枣 (*Phoenix dactylifera*)、梨 (*Pyrus ussuriensis* x *Pyrus*

communis)、芝麻 (*Sesamum indicum*)、菠菜 (*Spinacia oleracea*) 以及生姜 (*Zingiber officinale*) 等物种的蛋白序列与 *FtAPDSLX1* 蛋白序列具有一定的同源性, 利用软件 MEGA11 进行比对分析, 并绘制系统进化树 (图 6), 结果表明 *FtAPDSLX1* 与生姜 (A0A8J5FNQ4_ZINOF) 的蛋白序列最接近。

图 6 *FtAPDSLX1* 不同物种同源蛋白分析Fig. 6 Analysis of homologous proteins of *FtAPDSLX1* in different species

2.3 FtAPDSLX1 蛋白的表达模式分析

2.3.1 FtAPDSLX1 蛋白的亚细胞定位 天冬氨酸蛋白酶主要分布于植物的细胞质中,根据天冬氨酸蛋白酶的不同功能,其亚细胞定位具有显著差异性。构建亚细胞定位融合载体 pCAMBIA1305-FtAPDSLX1-GFP 并用农杆菌介导法通过注射使其

瞬时共转化到本氏烟草叶片背面,进行培养后使用激光共聚焦显微镜观察发现(图7),在核定位与1305载体共定位的视野中,均出现pCAMBIA1305-FtAPDSLX1-GFP 的荧光标记,由此推测 FtAPDSLX1 蛋白在细胞核与细胞质中均有分布。

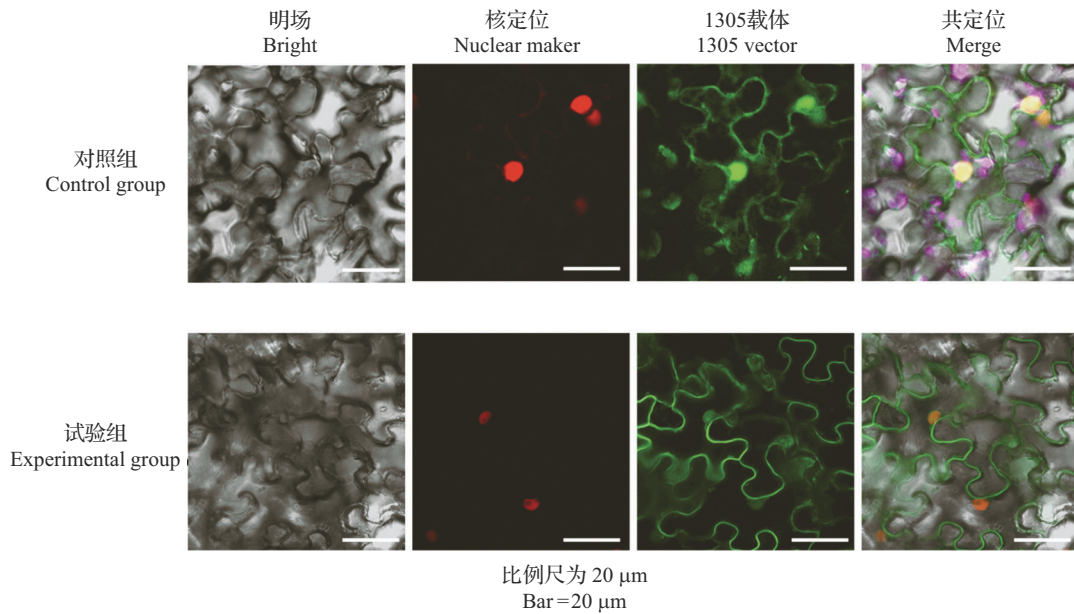
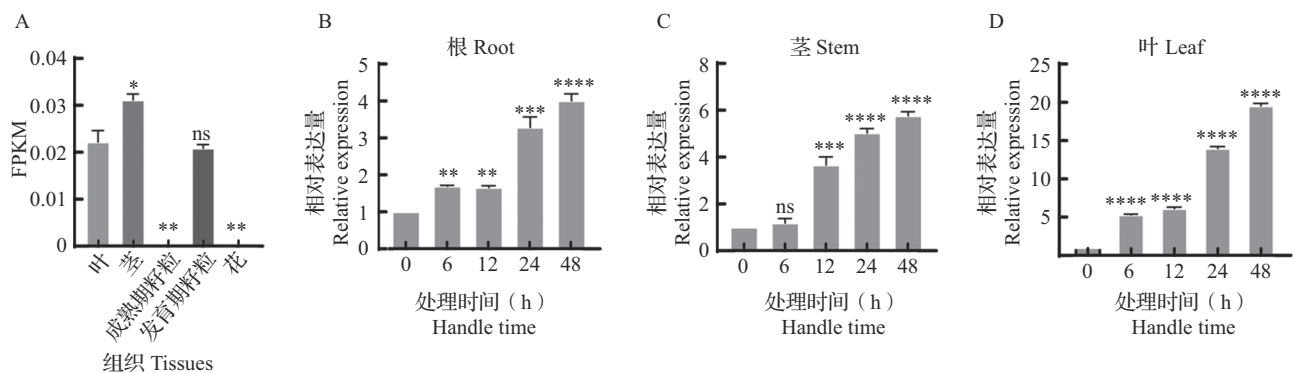


图7 FtAPDSLX1亚细胞定位信号
Fig. 7 Subcellular localization signal of FtAPDSLX1

2.3.2 FtAPDSLX1 基因的表达模式分析 对实验室已有转录组数据进行分析发现, FtAPDSLX1 主要在叶片、茎以及发育期籽粒中表达(图8A)。

为了进一步确定立枯丝核菌侵染过程中

FtADSPXL1 的响应模式,通过 qRT-PCR 对 FtAPDSLX1 在受立枯丝核菌侵染不同时间段的苦荞组织的表达量进行检测。结果表明,苦荞 FtAPDSLX1 基因在立枯丝核菌胁迫下被诱导从而上调表达。



和*分别表示 $P < 0.001$ 和 $P < 0.0001$ 水平上差异极显著; ns 表示无差异; 下同
和* indicate highly significant difference at the $P < 0.001$ and $P < 0.0001$ level, respectively; ns indicates no difference; The same as below

图8 苦荞不同组织与不同时间段中 FtAPDSLX1 的表达量
Fig. 8 Expression of FtAPDSLX1 in different tissues and at different time points in Fagopyrum tataricum

苦荞幼苗的根、茎、叶在受立枯丝核菌侵染的不同时间段, *FtAPDSLX1* 的表达量呈现显著的组织特异性(图 8)。苦荞幼苗在立枯丝核菌侵染胁迫下, 不同时间段中茎段和叶片中 *FtAPDSLX1* 表达量均高于根部, 且呈现出明显的时空表达特异性。在 0~48 h 内, 苦荞根、茎、叶中 *FtAPDSLX1* 基因表达量均显著上调。根据 *FtAPDSLX1* 表达量趋势可推测, *FtAPDSLX1* 参与苦荞对立枯丝核菌侵染胁迫的防御机制, 在 0~24 h 内基因表达上调且表达量增长速率较高, 而在 24~48 h 期间, 可能由于病菌侵染时间较长, 苦荞幼苗机体受损严重导致部分生理反应无法正常进行, *FtAPDSLX1* 的表达量增长速率下降。

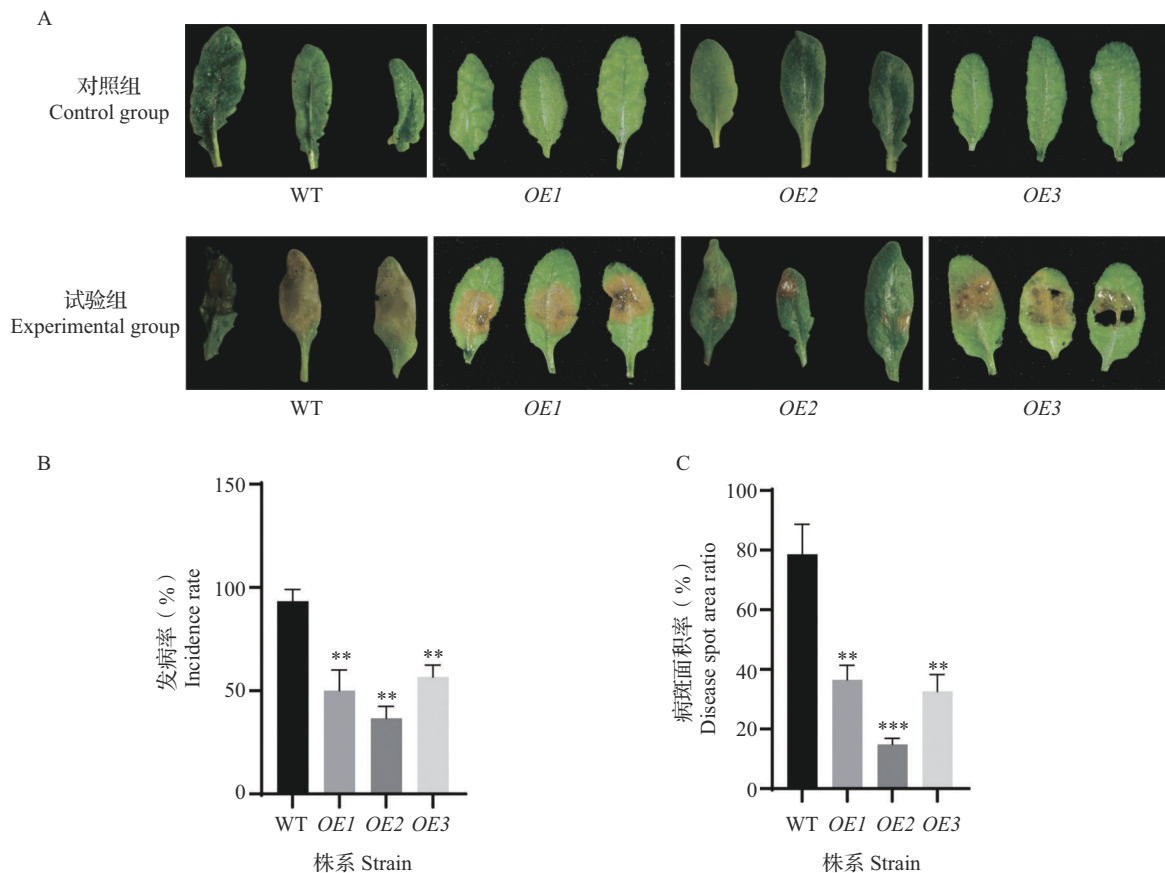
2.4 *FtAPDSLX1* 转基因表型分析

2.4.1 *FtAPDSLX1* 转基因拟南芥的立枯丝核菌抗性分析

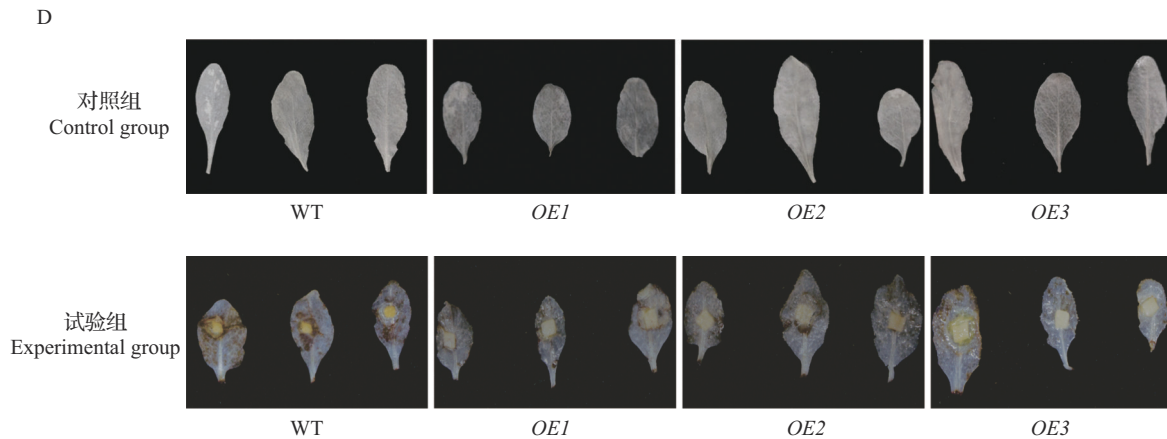
为了鉴定转 *FtAPDSLX1* 基因拟南芥的抗病性, 利用转 *FtAPDSLX1* 基因拟南芥与野生型拟南芥离体叶片进行立枯丝核菌接种。结果显示, 接种 24 h 后, 对照组中的离体叶片之间并未呈现出显著不同; 试验组 WT 的离体叶片的立枯丝核菌侵染痕迹较 *OE1*、*OE2*、*OE3* 的更为明显(图 9A)。对发病率进行统计, 结果显示, 野生型拟南芥 WT 离体叶片平均发病率达 93%, 而转基因拟南芥株系中, *OE1*

的平均发病率为 53%, *OE2* 平均发病率为 43%, *OE3* 平均发病率为 57%(图 9B)。转 *FtAPDSLX1* 基因拟南芥株系各组的离体叶片平均发病率均极显著低于野生型拟南芥 WT 离体叶片。对拟南芥立枯丝核菌接种后的病斑面积率进行统计, 结果显示野生型拟南芥离体叶片病斑面积率极显著大于转 *FtAPDSLX1* 基因拟南芥株系离体叶片病斑面积率(图 9C)。以上结果表明, 无论是病斑面积率抑或是发病率, 转 *FtAPDSLX1* 基因拟南芥株系 *OE1*、*OE2*、*OE3* 对立枯丝核菌的抗性均显著强于野生型拟南芥 WT。

二氨基联苯胺(DAB, diaminobenzidine)在过氧化物酶催化作用下发生化学反应, 在反应部位产生棕褐色沉淀物。DAB 染色试验结果进一步说明了 *FtAPDSLX1* 转基因拟南芥对立枯丝核菌的抗性显著强于野生型拟南芥。试验组中 *OE1*、*OE2*、*OE3* 和 WT 叶片上均呈现明显棕褐色沉淀, 而对照组中转基因拟南芥和野生型拟南芥离体叶片无显著差异(图 9D)。同时立枯丝核菌侵染 24 h 后, WT 离体叶片立枯丝核菌侵染痕迹较转基因株系离体叶片更为明显。进一步说明了转 *FtAPDSLX1* 基因拟南芥对立枯丝核菌的抗性显著强于野生型拟南芥。



(图 9)



WT为野生型拟南芥,OE1、OE2、OE3为不同转*FtAPDSLX1*基因拟南芥株系,下同;A:拟南芥病菌侵染结果;B:拟南芥发病率;
C:拟南芥病斑面积率;D:DAB染色结果

WT represents wild-type *Arabidopsis thaliana*, while OE1, OE2, OE3 represent different transgenic *Arabidopsis thaliana* lines expressing the *FtAPDSLX* gene, the same as below; A: Infection results of *Arabidopsis thaliana* by pathogens; B: *Arabidopsis thaliana* incidence rate; C: *Arabidopsis thaliana* disease spot area ratio; D: DAB staining results

图9 转基因拟南芥立枯丝核菌处理后的表型分析

Fig. 9 Phenotype analysis of transgenic *Arabidopsis thaliana* after treated with *Rhizoctonia solani*

2.4.2 病菌胁迫下转基因拟南芥中*FtAPDSLX1*的表达量 qRT-PCR结果显示,立枯丝核菌侵染0~24 h期间,转基因拟南芥中*FtAPDSLX1*的表达量均显著高于野生型拟南芥,而在12~24 h *FtAPDSLX1*表达量增长速率下降时期,转基因拟南芥中*FtAPDSLX1*的表达量达到了野生型拟南芥的3~5倍(图10)。上述结果表明,在立枯丝核菌侵染的胁迫下,转基因拟南芥中*FtAPDSLX1*基因可能参与拟南芥抗病响应,*FtAPDSLX1*表达量的显著提高,进而增强了转基因拟南芥的抗病性。

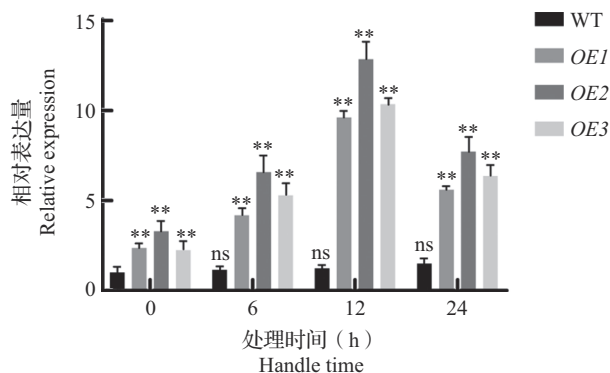
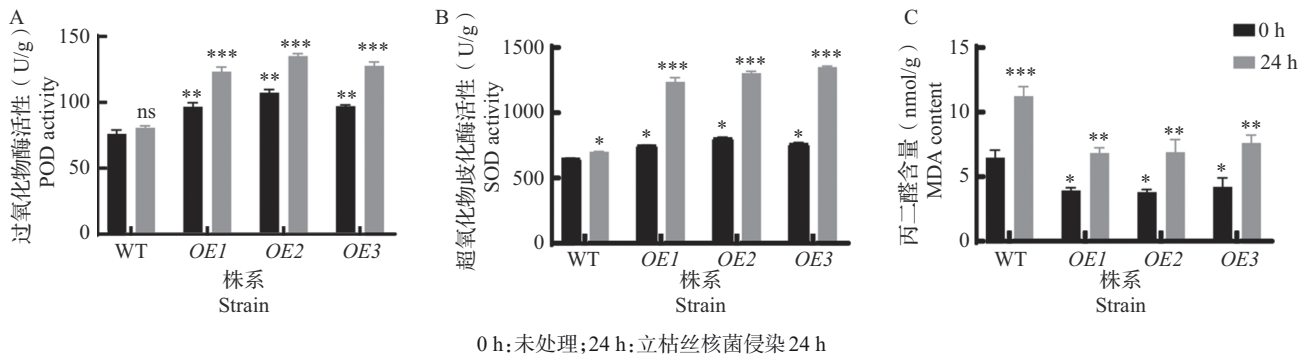


图10 立枯丝核菌侵染下转基因拟南芥株系*FtAPDSLX1*表达量分析

Fig. 10 Analysis of expression level of transgenic *Arabidopsis thaliana* line *FtAPDSLX1* under *Rhizoctonia solani* infection

2.4.3 *FtAPDSLX1*转基因拟南芥中抗病性相关酶的活性分析 过氧化物酶和超氧化物歧化酶活性作为活性氧清除相关的抗氧化酶,其活性的升高可降低自由基对细胞膜的损伤,降低植株所受到的氧化损伤^[28]。在针对植物的抗逆和抗病生理研究中,丙二醛含量可以侧面反映植物细胞的膜受损程度以及相应环境下植物响应胁迫的能力强弱^[30]。结果显示,经过立枯丝核菌侵染24 h后,与未经立枯丝核菌处理的对照组相比,野生型拟南芥中过氧化物酶活性与超氧化物歧化酶活性并未呈现出明显差异;而转*FtAPDSLX1*基因拟南芥株系中,过氧化物酶活性与超氧化物歧化酶活性显著上调。野生型拟南芥与转*FtAPDSLX1*基因株系在经过立枯丝核菌侵染24 h后,其丙二醛含量与对照相比显著上调;但与野生型拟南芥相比,转*FtAPDSLX1*基因拟南芥丙二醛含量的上调幅度受到了明显的抑制(图11)。结果说明,在受到立枯丝核菌胁迫时转*FtAPDSLX1*基因株系会上调体内的过氧化物酶和超氧化物歧化酶活性,并通过某种生化途径在一定程度上对丙二醛含量进行抑制,表明与野生型相比,转*FtAPDSLX1*基因株系抗病性较强。



0 h: Untreated; 24 h: Infected with *Rhizoctonia solani* for 24 hours; POD: Peroxidase; SOD: Superoxide dismutase; MDA: Malondialdehyde

图 11 转基因拟南芥抗病性相关生理指标检测

Fig. 11 Detection of physiological indicators related to disease resistance of transgenic *Arabidopsis thaliana*

3 讨论

立枯丝核菌是一种能诱导植物严重发病的土传病原真菌^[18-19],感染荞麦后会引发荞麦立枯病。苦荞植株遭到立枯丝核菌感染后,发病部位主要在叶片上,症状为出现椭圆形或不规则褐色病斑;同时会引起苦荞茎部凹陷性病变并且出现深棕色病斑,一段时间后引起植株坏死^[20]。迄今为止,关于荞麦对立枯丝核菌的抗性机制尚未得到清晰的解析。本研究通过对水杨酸、茉莉酸处理过的苦荞进行转录组测序分析发现,在外源施加水杨酸或茉莉酸后,天冬氨酸蛋白酶基因 *FtAPDSLX1* 的表达模式出现显著变化。

20世纪90年代,Rodrigo等^[21-22]通过烟草与番茄克隆得到天冬氨酸蛋白酶,并证实其参与了病程相关蛋白的降解。*CDR1*作为拟南芥中编码天冬氨酸蛋白酶的基因,在拟南芥中的表达被上调时,植株呈现出矮化抗病的表型;而当该基因表达受到抑制时,植株的抗病性显著下降^[23]。*CDR1*在水稻中存在同源基因 *OsCDR1*,在水稻受到植物抗病诱导剂水杨酸和苯并噻二唑诱导后,*OsCDR1*的表达量显著上调,说明 *OsCDR1*可能参与了水稻的抗病机制^[24]。

实验室前期工作证明,苦荞中由茉莉酸介导的天冬氨酸蛋白酶基因 *FtASP*,具有抗病相关功能,其蛋白对真菌的生长起到抑制作用^[15]。因此,推测 *FtAPDSLX1*可能参与苦荞中水杨酸或茉莉酸信号途径。不同抗性水平苦荞中 *FtAPDSLX1*的表达量测定发现,*FtAPDSLX1*在高抗病材料中的表达量更高,因此推测 *FtAPDSLX1*可能在苦荞抗立枯病分子机制中发挥重要作用。对 *FtAPDSLX1*启动子序列进行分析发现,其启动子中存在大量激素响应元

件。激素响应往往与植物抗病息息相关,特别是涉及到水杨酸或茉莉酸信号途径。比如在水稻中,*OsWRKY13*能增强水稻对病害的防御,*OsWRKY13*的表达受到防御信号分子的影响,水杨酸处理5 min后持续激活 *OsWRKY13*表达,而受到茉莉酸处理后从5 min开始被激活,30 min开始消失^[25]。促进水稻抗病毒防御的核心RNA沉默元件 *AG018*在茉莉酸甲酯处理1 h后 mRNA水平上升,而在此期间,多个茉莉酸通路基因 *OsCO11A*、*OsJAMYB*和 *OsJAZ6*的表达量也同步增加^[26]。与之相似的是,在本研究中 *FtAPDSLX1*在茉莉酸处理1 h时表达量上升;在水杨酸处理4 h后表达量上升直到12 h,推测 *FtAPDSLX1*在苦荞中参与抗立枯丝核菌病害。与此同时还在 *FtAPDSLX1*的异源过表达转基因拟南芥材料中证实了这一推测,将转基因植株以及野生型拟南芥通过DAB染色实验进行对比,发现 *FtAPDSLX1*转基因植株的抗病性明显强于野生型拟南芥,因此推测天冬氨酸蛋白酶基因 *FtAPDSLX1*在苦荞受到立枯丝核菌胁迫的情况下,参与了苦荞的抗病防御机制。此外鉴于金荞对荞麦属病害的抗性强于苦荞,将 *FtAPDSLX1*与金荞中的同源基因 *FD07G01375*进行比对分析,也许由于空间结构上的差异,导致 *FD07G01375*蛋白可能具有更强的蛋白活性,从而使金荞具有更强的抗病性。

对异源过表达 *FtAPDSLX1*拟南芥的生理指标进行检测发现,在受到立枯丝核菌感染时,过表达拟南芥株系的过氧化物酶和超氧化物歧化酶的活性显著上升。过氧化物酶和超氧化物歧化酶作为活性氧清除相关的抗氧化酶,其活性的升高可降低自由基对细胞膜损伤,从而降低植株所受到的氧化损伤^[27]。茉莉酸对过氧化物酶、超氧化物歧化酶等抗氧化酶活性具有上调作用,推测 *FtAPDSLX1*可能

参与茉莉酸途径提高了过氧化物酶、超氧化物歧化酶活性,进而维持植物细胞蛋白稳态,最终提高了苦荞对立枯丝核菌的抗性。研究证明,过氧化物酶和超氧化物歧化酶活性可以显著影响大豆菌核病菌致病力^[28]。在本研究结果中,*FtAPDSLXI*可能通过影响过氧化物酶和超氧化物歧化酶活性降低苦荞遭受立枯丝核菌侵染时活性氧积累,从而影响立枯丝核菌致病性。丙二醛为脂质过氧化损伤的终产物之一,可以反映植物机体脂质过氧化速率和强度^[29]。在针对植物的抗逆和抗病生理研究中,丙二醛含量可以侧面反映植物细胞的膜受损程度以及相应环境下植物响应胁迫的能力强弱^[30]。*FtAPDSLXI*转基因拟南芥在受到病菌侵染后,其丙二醛含量的上升幅度显著低于野生型拟南芥,说明*FtAPDSLXI*过表达拟南芥相较于野生型拟南芥在受到立枯丝核菌侵染时受损程度更低。综上所述,*FtAPDSLXI*过表达拟南芥在受到立枯丝核菌侵染时,植株通过上调过氧化物酶和超氧化物歧化酶活性,同时降低丙二醛含量以增强植株对立枯丝核菌的抗病性。

综上,本研究通过转录组分析、生物信息学分析、异源转化拟南芥等手段发掘并研究了*FtAPDSLXI*的功能,证明其在苦荞对立枯丝核菌的抗性中发挥着重要作用,为苦荞抗病种质的选育提供了理论基础,同时也为其他作物的分子生物育种的基因筛选提供了参考。

参考文献

- [1] Zhang K, He M, Fan Y, Zhao H, Gao B, Yang K, Li F L, Tang Y, Gao Q, Lin T, Muriel Q, Janovská D, Meglič V, Kwiatkowski J, Romanova O, Chrungoo N, Suzuki T, Luther Z, Germ M, Woo S H, Georgiev M I, Zhou M. Resequencing of global tartary buckwheat accessions reveals multiple domestication events and key loci associated with agronomic traits. *Genome Biology*, 2021, 22(1):1-17
- [2] Joshi D C, Zhang K, Wang C, Chandora R, Khurshid M, Li J, He M, Georgiev M I, Zhou M. Strategic enhancement of genetic gain for nutraceutical development in buckwheat: A genomics-driven perspective. *Biotechnology Advances*, 2020, 34(39): 107479
- [3] Joshi D C, Chaudhari G V, Sood S, Kant L, Pattanayak A, Zhang K, Fan Y, Janovská D, Meglič V, Zhou M. Revisiting the versatile buckwheat: Reinvigorating genetic gains through integrated breeding and genomics approach. *Planta*, 2019, 250(3): 783-801
- [4] 范昱, 丁梦琦, 张凯旋, 杨克理, 唐宇, 方洸, 周美亮. 荞麦种质资源概况. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(4): 813-828
Fan Y, Ding M Q, Zhang K X, Yang K L, Tang Y, Fang W, Zhou M L. Overview of buckwheat germplasm resources. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(4): 813-828
- [5] Dong X, Tang Y, Ding M, Li W, Li J, Wu Y, Shao J, Zhou M. Germplasm resources of buckwheat in China and their forage value. *Pratacultural Science*, 2017, 11(2): 378-388
- [6] 齐杨菊, 陈振江, 李振霞, 刘辉, 王莉花, 李春杰. 荞麦病害研究进展. *草业科学*, 2020, 37(1): 75-86
Qi Y J, Chen Z J, Li Z X, Liu H, Wang L H, Li C J. Progress in research on the diseases of buckwheat. *Pratacultural Science*, 2020, 37(1): 75-86
- [7] Liu X, Zhou S, Chen S, Yi Z, Pan H, Yao R. Buckwheatdisease recognition based on Convolution Neural Network. *Applied Sciences*, 2022, 12(9): 4795
- [8] 赵江林, 江兰, 钟灵允, 谭茂玲, 赵钢. 荞麦立枯病病原菌的分离与鉴定//中国植物病理学会. 中国植物病理学会2018年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2018: 33
Zhao J L, Jiang L, Zhong L Y, Tan M L, Zhao G. Isolation and identification of pathogenic bacteria from buckwheat blight. // Chinese Society for Plant Pathology. Proceedings of the 2018 annual conference of chinese society for plant pathology. Beijing: China Agricultural Sciences and Technology Press, 2018: 33
- [9] 李光胜, 卢翔, 刘洋, 张凯旋, 王海华, 唐新科, 周美亮. 苦荞*FtEIN3*基因的克隆及其抗立枯病功能分析. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(5): 1389-1400
Li G S, Lu X, Liu Y, Zhang K X, Wang H H, Tang X K, Zhou M L. Cloning and functional analysis of the *FtEIN3* gene in tartary buckwheat against bacterial blight. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(5): 1389-1400
- [10] 李森, 卢瑞芳. 提高荞麦的抗病性. *国外农学-杂粮作物*, 1992(5): 46-49
Li M, Lu R F. Enhance the disease resistance of buckwheat. *Foreign Agriculture-Minor Cereal Crops*, 1992(5): 46-49
- [11] Alexander R D, Wendelboe-Nelson C, Morris P C. The barley transcription factor *HvMYB1* is a positive regulator of drought tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 9(142): 246-253
- [12] Saavedra G M, Sanfuentes E, Figueroa P M, Figueroa C R. Independent preharvest applications of methyl jasmonate and chitosan elicit differential upregulation of defense-related genes with reduced incidence of gray mold decay during postharvest storage of fragaria chiloensis fruit. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(7): 1420
- [13] Qi G, Chen J, Chang M, Chen H, Hall K, Korin J, Liu F, Wang D, Fu Z Q. Pandemonium breaks out: Disruption of salicylic acid-mediated defense by plant pathogens. *Molecular Plant*, 2018, 11(12): 1427-1439
- [14] Malamy J, Carr J P, Klessig D F, Raskin I. Salicylic Acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 1990, 250(4983): 1002-1004
- [15] He Y Q, Zhang K X, Li S J, Lu X, Zhao H, Guan C N, Huang X, Shi Y L, Kang Z, Fan Y, Li W, Chen C, Li G S,

- Long O, Chen YY, Hu M, Cheng J P, Xu B L, Mark A Chapman, Milen I Georgiev, Alisdair R Fernie, Zhou M L. Multiomics analysis reveals the molecular mechanisms underlying virulence in Rhizoctonia and jasmonic acid-mediated resistance in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Plant Cell*, 2023, 35(8): 2773-2798
- [16] Zhang Z, Jiang C, Chen C, Su K, Lin H, Zhao Y, Guo Y. VvWRKY5 enhances white rot resistance in grape by promoting the jasmonic acid pathway. *Horticulture Research*, 2023, 10(10): 172
- [17] Yu Y H, Jiao Z L, Bian L, Wan Y T, Yu K K, Zhang G H, Guo D L. Overexpression of vitis vinifera VvZIP60 enhances *Arabidopsis thaliana* resistance to powdery mildew via the salicylic acid signaling pathway. *Scientia Horticulturae*, 2019, 10(256): 108640
- [18] Hunjan M S, Kumar S, Lore J S, Cruz C M V. Efficiency of different rhizoctonia solani inoculum source against sheath blight screening in rice under field conditions. *Tropical Plant Pathology*, 2022, 47(2): 309-313
- [19] Kotba I, Achouri M, Benbouazza A, Achbani E H. Morphological, pathogenic and molecular characterisation of rhizoctonia solani strains isolated from potato. *Scienc Edomain International*, 2018, 11(4): 1-16
- [20] 徐琴琴, 陈卫良, 毛碧增. 立枯丝核菌毒素的研究进展. *核农学报*, 2020, 34(10): 7
- Xu Q Q, Chen W L, Mao B Z. Research progresses in phytotoxin produced by Rhizoctonia solani. *Journal of Nuclear Agriculture*, 2020, 34(10): 7
- [21] Rodrigo I, Vera P, Conejero V. Degradation of tomato pathogenesis-related proteins by an endogenous 370 kDa aspartyl endoproteinase. *European Journal of Biochemistry*, 1989, 184(3): 663-669
- [22] Rodrigo I, Vera P, Van Loon L C, Conejero V. Degradation of tobacco pathogenesis-related proteins: Evidence for conserved mechanisms of degradation of pathogenesis-related proteins in plants. *Plant Physiology*, 1991, 95(2): 616-622
- [23] Xia Y J, Suzuki H, Borevitz J, Blount J, Guo Z J, Patel K, Dixon R A, Lamb C. An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis thaliana* disease resistance signaling. *The EMBO Journal*, 2014, 23(4): 980-988
- [24] Qiu D, Xiao J, Ding X, Xiong M, Cai M, Cao Y, Li X, Xu C, Wang S. OsWRKY13 mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate and jasmonate-dependent signaling. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2007, 20(5): 492-499
- [25] Yang Z, Huang Y, Yang J, Yao S, Zhao K, Wang D, Qin Q, Bian Z, Li Y, Lan Y, Zhou T, Wang H, Liu C, Wang W, Qi Y, Xu Z, Li Y. Jasmonate signaling enhances RNA silencing and antiviral defense in rice. *Cell Host & Microbe*, 2020, 28(1): 89-103
- [26] Ma W, Pang Z, Huang X, Xu J, Pandey S S, Li J, Achor D S, Vasconcelos F N C, Hendrich C, Huang Y, Wang W, Lee D, Stanton D, Wang N. Citrus Huanglongbing is a pathogen-triggered immune disease that can be mitigated with antioxidants and gibberellin. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 1-13
- [27] 刘银萍. '洛阳红'花期花瓣抗氧化酶SOD, POD和CAT活性的研究. *河南林业科技*, 2020, 40(3): 13-15, 41
- Liu Y P. The study of antioxidants of 'Luoyanghong' on petals about SOD, POD, CAT during florescences. *Henan Forestry Science and Technology*, 2020, 40(3): 13-15, 41
- [28] 李易初, 石凤梅, 马立功, 刘佳, 孟庆林. 核盘菌菌丝内POD和SOD活性与其对大豆致病力关系初探. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2021, 33(1): 1-6, 14
- Li Y C, Shi F M, Ma L G, Liu J, Meng Q L. The relationship between POD and SOD activities of nuclear and its pathogenicity to soybean. *Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural Reclamation University*, 2021, 33(1): 1-6, 14
- [29] Pilarska M, Skowron E, Pietras R, Krupinska K, Niewiadomska E. Changes in lipid peroxidation in stay-green leaves of tobacco with senescence-induced synthesis of cytokinins. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2017, 9(118): 161-167
- [30] Li J, Feng L, Li D, Liu X L, Pan Y Y, He J, Zhang J X. ROS regulate NCF2, key metabolic enzymes and MDA levels to affect the growth of fusarium solani. *Agriculture*, 2022, 12(11): 1840