

网络出版时间: 2026-04-01

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/61.1359.S.20260331.1031.004>

禾谷镰刀菌木聚糖酶 FGSG_03624 互作蛋白筛选及其与小麦通用应激蛋白 TaUSP-1A 的互作分析

刘洋¹, 白裔凡¹, 陈孝月¹, 司红起², 蔡华¹

(1. 滁州学院生物与食品工程学院, 安徽滁州 239000; 2. 安徽农业大学农学院, 安徽合肥 230000)

摘要: 禾谷镰刀菌木聚糖酶 FGSG_03624 在侵染小麦过程中具有破坏细胞壁并诱导细胞坏死激活免疫反应的双重功能。为进一步解析 FGSG_03624 激发免疫的分子机制, 通过生物信息学预测和烟草叶片瞬时表达对 FGSG_03624 进行了亚细胞定位分析; 以 FGSG_03624 为诱饵蛋白进行酵母双杂交, 从禾谷镰刀菌侵染的小麦安农 1589 穗部 cDNA 文库中筛选互作蛋白, 经回转实验、荧光素酶互补实验和双分子荧光互补实验进一步验证蛋白互作关系; 利用 qRT-PCR 分析候选互作蛋白响应基因 *TaUSP-1A* 的表达, 并鉴定转 *TaUSP-1A* 基因拟南芥的抗病性。结果表明, FGSG_03624 为位于细胞壁和/或细胞间隙的分泌蛋白, 后续需采用分裂泛素系统膜体系酵母双杂交技术筛选其互作蛋白。以 pBT3STE-FGSG_03624 为诱饵载体, 在添加 12 mmol · L⁻¹ 3-AT 的条件下筛选小麦 cDNA 文库, 共获得 40 个可能与 FGSG_03624 互作的蛋白, 功能涉及转录调控、信号传导、胁迫响应、膜运输和植物-病原菌互作等方面。其中, 与胁迫响应相关的小麦通用应激蛋白 TaUSP-1A 被证实与 FGSG_03624 互作。TaUSP-1A 基因在禾谷镰刀菌侵染后上调表达, 在拟南芥中过表达 TaUSP-1A 基因能增强植株对病原菌的抗性。以上结果说明, FGSG_03624 可能通过与 TaUSP-1A 等寄主蛋白互作激发小麦免疫反应。

关键词: 禾谷镰刀菌; 木聚糖酶 FGSG_03624; 小麦; 酵母双杂交; 通用应激蛋白 TaUSP-1A

中图分类号: S512.1; S330

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2026)05-0623-12

Screening of *Fusarium graminearum* Xylanase FGSG_03624 Interacting Proteins and Analysis of Its Interaction with Wheat Universal Stress Protein TaUSP-1A

LIU Yang¹, BAI Yifan¹, CHEN Xiaoyue¹, SI Hongqi², CAI Hua¹

(1. School of Biology and Food Engineering, Chuzhou University, Chuzhou, Anhui 239000, China;

2. School of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230000, China)

Abstract: The *Fusarium graminearum* xylanase FGSG_03624 exerts dual functions during wheat infection: it disrupts cell wall integrity and induces cell necrosis to activate plant immune responses. To further clarify the molecular mechanism underlying FGSG_03624-triggered immunity, subcellular localization of FGSG_03624 was analyzed via bioinformatics prediction and transient expression in *Nicotiana benthamiana* leaves. Yeast two-hybrid assay was performed using FGSG_03624 as the bait to screen interacting proteins from the wheat (Anong 1589) spike cDNA library constructed after *F. graminearum* infection. The protein-protein interactions were further verified by Y2H assay, luciferase complementation assay (LCA), and bimolecular fluorescence complementation assay (BiFC). The expression patterns of candidate interacting protein gene *TaUSP-1A* were analyzed by qRT-PCR, and the disease resistance of transgenic *Arabidopsis thaliana* was evaluated. Results indicated that FGSG_

收稿日期: 2025-09-10 修回日期: 2026-01-06

基金项目: 安徽省高校自然科学研究重点项目 (2022AH051088); 滁州学院科研启动基金项目 (2022qd50); 安徽省高校自然科学研究重大项目 (2023AH040223)

第一作者 E-mail: 897064987@qq.com (刘洋)

通讯作者 E-mail: chczh@163.com (蔡华)

03624 is a secreted protein localized to the cell wall and/or intercellular spaces. Subsequent identification of its interacting proteins should be conducted the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system. Using pBT3STE-FGSG_03624 as the bait vector, 40 potential FGSG_03624-interacting proteins were identified from the wheat cDNA library under the condition of adding $12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-AT. These proteins are involved in transcriptional regulation, signal transduction, stress response, membrane transport, and plant-pathogen interaction. Among them, wheat universal stress protein TaUSP-1A, associated with stress response, was confirmed to interact with FGSG_03624. *TaUSP-1A* expression was upregulated after *F. graminearum* infection, and its overexpression in *Arabidopsis thaliana* enhanced plant resistance to the pathogen. These findings indicate that FGSG_03624 may trigger wheat immune responses through interactions with host proteins such as TaUSP-1A.

Keywords: *Fusarium graminearum*; Xylanase FGSG_03624; Wheat; Yeast two-hybrid; Universal stress protein TaUSP-1A

禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)是引起小麦(*Triticum aestivum* L.)赤霉病(*Fusarium head blight*, FHB)的主要病原真菌,其在花期侵染小麦会抑制籽粒灌浆,并产生和积累多种真菌毒素,导致小麦减产、品质变差,甚至引起食品安全问题^[1]。农药是防治小麦赤霉病最有效的方式,但农药残留会对人类健康和环境造成损害^[2]。因此,发掘和利用优良抗病基因,选育和推广抗赤霉病小麦品种是解决赤霉病危害最安全经济的途径之一^[3-4]。

在侵染小麦初期禾谷镰刀菌通过分泌纤维素酶、果胶质酶、木聚糖酶等多种细胞壁裂解酶(CWDEs)破坏寄主细胞壁,以摄取养分,并定殖在寄主组织使之感病^[5]。通过蛋白质组学分析发现,病原菌在入侵小麦穗过程中分泌的木聚糖酶主要属于GH10和GH11两类家族,如FGSG_03624、FGSG_11487和FGSG_10999等^[6],这些酶可随机裂解 β -1,4-糖苷键,进而降解寄主细胞壁中的木聚糖^[7-9];除此之外,它们还能诱导寄主细胞坏死和防御反应^[10-12]。Sella等^[10]用毕赤酵母菌异源表达的FGSG_03624分别浸染小麦幼叶和外稃,浸染后的小麦组织会出现细胞坏死和过氧化氢积累,即使酶经热失活仍可诱导同样的症状。虽然FGSG_03624并非禾谷镰刀菌致病所必需,但其在侵染过程中可作为坏死因子激发植物免疫^[10]。序列分析发现,FGSG_03624含有一段保守短肽(QKKGEINIDGS),与已知激发子绿色木霉(*Trichoderma viride*)乙烯诱导木聚糖酶(ethylene-inducing xylanase, EIX)和灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)木聚糖酶(xylanase 11A, Xyn11A)中激活宿主免疫的关键片段相似,因此

推测FGSG_03624诱导细胞死亡及激活免疫反应可能与这段保守短肽有关,而与其酶活性无关^[11]。Tundo等^[12]进一步研究证实,瞬时或组成型表达无酶活性的FGSG_03624仍可增加病原菌侵染部位胼胝质的沉积,增强植物免疫能力,降低病原菌的生物积累量,从而减轻病害程度。

综上,FGSG_03624在禾谷镰刀菌侵染小麦过程中兼具降解小麦细胞壁木聚糖和诱导细胞程序性死亡而激发小麦免疫响应的双重功能。为了筛选FGSG_03624调控小麦免疫反应过程中的互作蛋白,本研究利用酵母双杂交技术,以FGSG_03624为诱饵蛋白,从受禾谷镰刀菌侵染的小麦穗部酵母cDNA文库中筛选与之互作的蛋白,分析互作蛋白可能具有的生物学功能,为进一步解析FGSG_03624激活小麦免疫反应的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料为中抗赤霉病小麦品种安农1589,于2024—2025年种植于安徽滁州学院小麦试验基地,待抽穗扬花期对每朵小花注射 $10 \mu\text{L}$ 禾谷镰刀菌(混合菌株,孢子 5×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,由安徽农业大学农学院提供),分别于接种后0、12、24、36、48和72 h剪取麦穗,液氮速冻后保存于 -80°C 冰箱备用。

接种禾谷镰刀菌的小麦(安农1589)穗部酵母双杂交cDNA文库,酵母双杂交所需载体pBT3-N、pBT3-STE、pBT3-SUC、pPR3-N、pOst1-NubI(野生型猎物质粒)、pTSU2-APP(阳性对照诱饵质粒)、pNubG-Fe65(阳性对照猎物质粒)等由上海欧易

生物医学科技有限公司提供。植物表达载体 pHZM27-EGFP、pHZM33-GUS、pCAMBIA1300-nLUC、pCAMBIA1300-cLUC、pUC-SPYCE、pUC-SPYNE、克隆质粒 pBlunt-FGSG_03624(含 FGSG_03624 CDS 序列全长)由滁州学院小麦育种实验室保存。

1.2 试验方法

1.2.1 载体构建

分别以前期保存的克隆质粒 pBlunt-FGSG_03624、本研究通过酵母双杂交筛选获得的猎物质粒 pPR3N-TaUSP-1A 为模板,使用表 1 中的同源重组引物和 Phanta 高保真酶(诺唯赞,南京)扩增 FGSG_03624 与 TaUSP-1A 编码区序列。通过胶回收试剂盒(诺唯赞,南京)纯化 PCR 产物,再经同源重组酶(诺唯赞,南京)连接至相应限制性内切酶酶切的载体上(表 1)。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α (唯地,上海)进行克隆、测序。最终构建 pHZM27-FGSG_03624-EGFP、pBT3N-FGSG_03624、pBT3STE-FGSG_03624、pBT3SUC-FGSG_03624、pCAMBIA1300-TaUSP-1A-nLUC、pCAMBIA1300-FGSG_03624-cLUC、pUC-TaUSP-1A-SPYNE、pUC-FGSG_03624-SPYCE、pHZM33-TaUSP-1A 重组载体。

1.2.2 FGSG_03624 的亚细胞定位

利用在线网站 SignalP 4.1(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)、TMHMM-2.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)、Cell-PLoc 2.0(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>)和 CELLO v. 2.5(<http://cello.life.nctu.edu.tw/>)对 FGSG_03624(XP_011322077.1)分别进行信号肽、跨膜结构和亚细胞定位预测。

参考说明书,采用液氮冻融法将 pHZM27-FGSG_03624-EGFP 和 pHZM27-EGFP 分别转化至农杆菌 GV3101 感受态细胞(唯地,上海),经菌液 PCR 鉴定后,于 YEB 培养基中 28 ℃ 振荡培养至 $OD_{600} = 1.2 \sim 1.6$ 。离心收集菌体,并用悬浮液($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MES}$ 和 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ AS}$)洗涤、重悬至 $OD_{600} \approx 0.8$,28 ℃ 避光静置 2~3 h 后将菌液注入 6~8 周龄本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)叶片下表皮,避光培养 24~48 h,取侵染的叶片进行激光共聚焦显微镜观察。

1.2.3 FGSG_03624 诱饵载体的选择

参考说明书,采用 PEG/LiAC 法将 pBT3N-

FGSG_03624、pBT3STE-FGSG_03624、pBT3SUC-FGSG_03624 分别与 pOst1-NubI 共转化至 NMY51 酵母细胞(唯地,上海)作为功能检测组;分别与 pPR3-N 共转化作为自激活检测组。以 pTSU2-APP + pNubG-Fe65 为阳性对照,pTSU2-APP + pPR3-N 为阴性对照,经菌液 PCR 验证阳性克隆,将酵母菌分别点于 DDO(SD/-Leu/-Trp)和 QDO/X/3-AT [SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-gal/3-AT, 含 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ X-gal}$ 及不同浓度 3-AT(0、3、6、9 和 $12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)]平板,30 ℃ 培养 3~5 d 后观察菌落生长情况。

1.2.4 酵母双杂交筛选 cDNA 文库及互作蛋白分析

(1)与 FGSG_03624 互作蛋白的鉴定。将 pBT3STE-FGSG_03624 转化至 NMY51 酵母细胞,使用酵母感受态制备试剂盒(普因特,武汉)制备成感受态后转入酵母双杂交 cDNA 文库质粒,再涂布于 QDO/X/3-AT($12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)平板进行初筛。挑取生长正常、显蓝色的菌落至 DDO 和 QDO/X/3-AT($12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)平板进行复筛。用酵母质粒提取试剂盒(索莱宝,北京)提取复筛阳性酵母菌株质粒,转化至大肠杆菌 DH5 α 进行克隆、测序。测序结果在小麦多组学网站(<http://wheatomics.sdau.edu.cn/>)中进行 Blast 检索,以确定候选互作蛋白对应的基因编号及功能注释。

(2)互作蛋白的回转验证。将筛选得到的猎物质粒(pPR3N-候选蛋白基因)分别与 pBT3STE-FGSG_03624 共转化至 NMY51 酵母细胞中,经菌液 PCR 鉴定后将阳性转化子在 DDO 液体培养基中培养至 $OD_{546} \approx 1.0$,再稀释 10 倍、100 倍、1 000 倍,各取 3 μL 点样于 DDO 和 QDO/X/3-AT($12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)平板上,30 ℃ 培养 3~5 d,观察酵母菌落的生长状况。实验中 pBT3STE-FGSG_03624 + pOst1-NubI 为阳性对照,pBT3STE-FGSG_03624 + pPR3-N 为阴性对照。

(3)在本氏烟草中验证蛋白互作。通过农杆菌 GV310 介导的瞬时转化,在本氏烟草中进行荧光素酶互补实验(LCA)和双分子荧光互补实验(BiFC)。LCA 实验中,实验组共表达 pCAMBIA1300-TaUSP-1A-nLUC 与 pCAMBIA1300-FGSG_03624-cLUC,对照组为 pCAMBIA1300-TaUSP-1A-nLUC 与 pCAMBIA1300-cLUC、pCAMBIA1300-nLUC 与 pCAMBIA1300-FGSG_03624-cLUC、pCAMBIA1300-nLUC 与 pCAMBIA1300-

cLUC 共表达;注射后的烟草避光培养 24 h 后,在注射点涂抹 D-荧光素钾盐底物,置于活体荧光成像系统中进行观察、拍照。BiFC 实验中,实验组共表达 pUC-TaUSP-1A-SPYNE 与 pUC-FGSG_03624-SPYCE,对照组为 pUC-TaUSP-1A-SPYNE 与 pUC-SPYCE,pUC-SPYNE 与 pUC-FGSG_03624-SPYCE 共表达;注射后的烟草避光培养 24~48 h,取侵染的烟草叶片用激光共聚焦显微镜观察。

1.2.5 互作蛋白响应基因TaUSP-1A 的表达分析

从 1.1 中接种禾谷镰刀菌不同时间点的安农 1589 小麦穗部提取总 RNA,并反转录为 cDNA,稀释 5 倍后作为模板,使用 qRT-PCR 引物 qTaUSP-1A-F/R(表 1),以 TaActin 为内参基因,检测 TaUSP-1A 在禾谷镰刀菌处理下的表达情况,采用 2^{-ΔΔCt} 方法计算基因的相对表达量。

1.2.6 过表达TaUSP-1A 基因拟南芥的筛选及其抗病性鉴定

将 pHZM33-TaUSP-1A 转入农杆菌 GV3101 中,采用花序浸染法获得 T₀ 代转基因拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[13]。种植 T₀ 代植株,在四叶期喷施 Basta 除草剂(0.1%)进行抗性筛选;同时使用引物 qTaUSP-1A-F/R(表 1)对阳性苗进行 RT-PCR 鉴定,以拟南芥 *AtActin2* (NM_001338358.1)为内参基因。阳性植株继续筛选至纯合系^[14]。

分别取转基因拟南芥和野生型拟南芥离体莲座叶片,创伤处理后接种 5 μL 禾谷镰刀菌孢子悬浮液(5×10⁵ 个·mL⁻¹),将叶柄嵌入到灭菌后的 0.7% 固体琼脂中,放置在培养箱内培养 5~7 d (光/暗周期 16 h/8 h,相对湿度 100%,温度 22 ℃),观察发病情况,每株 3 次生物学重复^[15]。

表 1 本试验使用的引物及 PCR 产物插入位点
Table 1 Primers used in the study and insertion sites of PCR products

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	用途 Use of primer	插入位点 Insertion site
pHZM27-FGSG_03624-F	AGAGGACACGCTCGAGATGGTCTCCTTCACCTACCTTCT	pHZM27-FGSG_03624-EGFP	Xho I/Avr II
pHZM27-FGSG_03624-R	CCATGAGCTCCCTAGGTCCAGAGACAGTCATGGTAGCC		
pBT3N-FGSG_03624-F	ATTCTGCAGGGCCATTACGGCCATGGTCTCCTTCACCTACCTTCT	pBT3N-FGSG_03624	Sfi I/Nco I
pBT3N-FGSG_03624-R	TAGCTACTTACCATGGTTATCCAGAGACAGTCATGGTAGC		
pBT3STE-FGSG_03624-F	TTATGTAATGGCCATTACGGCCGTCTCCTTCACCTACCTTCTCGCC	pBT3STE-FGSG_03624	Sfi I/Pst I
pBT3STE-FGSG_03624-R	TATCGAATTCCTGCAGGGTCCAGAGACAGTCATGGTAGCCTG		
pBT3SUC-FGSG_03624-F	TATCTGCAATGGCCATTACGGCCGCTCCCAACCCTACCAAGGTTG	pBT3SUC-FGSG_03624	Sfi I/Pst I
pBT3SUC-FGSG_03624-R	TATCGAATTCCTGCAGGGTCCAGAGACAGTCATGGTAGCCTG		
FGSG_03624-cLUC-F	TGGCGGAGGTCAGATCATGGTCTCCTTCACCTACCTTCT	pCAMBIA1300-FGSG_03624-cLUC	Bgl II
FGSG_03624-cLUC-R	GGACGCGTACGAGATCTTATCCAGAGACAGTCATGGTAGC		
TaUSP1A-nLUC-F	TCGGTACCCGGGATCCATGGCTGCGGACGGCGAG	pCAMBIA1300-TaUSP-1A-nLUC	BamH I/Spe I
TaUSP1A-nLUC-R	TCTGGTCGACACTAGTGGCATGGTTACTCGCTGGCT		
FGSG_03624-SPYCE-F	CACGGGGGACTCTAGAATGGTCTCCTTCACCTACCTTCT	pUC-FGSG_03624-SPYCE	Xba I/Xho I
FGSG_03624-SPYCE-R	GAGCGGTACCCTCGAGTCCAGAGACAGTCATGGTAGCC		
TaUSP1A-SPYNE-F	CACGGGGGACTCTAGAATGGCTGCGGACGGCGAG	pUC-TaUSP-1A-SPYNE	Xba I/Xho I
TaUSP1A-SPYNE-R	GAGCGGTACCCTCGAGGCATGGTTACTCGCTGGCT		
pHZM33-TaUSP1A-F	GGAGAGGACACCTAGGATGGCTGCGGACGGCGAG	pHZM33-TaUSP-1A	Avr II/Spe I
pHZM33-TaUSP1A-R	GACTCTAGGGACTAGTTTACGGCATGGTTACTCGCTGGCT		
qTaUSP1A-F	TTCTCGCTCTCCCAACTTT	表达分析和转基因拟南芥鉴定 Expression analysis and identification of transgenic <i>Arabidopsis thaliana</i>	—
qTaUSP1A-R	AGGACTTTTGAAACCACGGAG		
qTaActin-F	GTGAGCCACACTGTTCCAATCTATG		
qTaActin-R	CCACCGATCCAGACACTGTATTTC	表达分析 Expression analysis	—
AtActin-F	CCTGAAGTATCCTATTGAGC		
AtActin-R	GGTCTTTGAGGTTTCCATCT	转基因拟南芥鉴定 Identification of transgenic <i>Arabidopsis thaliana</i>	—

下划线表示载体的同源臂序列。
The underlines indicate the homologous arm sequence of the vector.

2 结果与分析

2.1 FGSG_03624 蛋白结构分析及亚细胞定位

SignalP 4.1 与 TMHMM-2.0 分析显示, FGSG_03624 蛋白不含跨膜结构域(图 1A),其 N 端第 1~19 位氨基酸构成信号肽(图 1B),表明 FGSG_03624 可能为胞外蛋白;Cell-PLoc 2.0 与 CELLO V2.5 网站均预测 FGSG_03624 蛋白定位于细胞外。为验证预测结果,利用农杆菌介导的瞬时转化在本氏烟草叶片上表达 pHZM27-EGFP 和 pHZM27-FGSG_03624-EGFP。使用激光共聚焦显微镜观察,对照(pHZM27-EGFP)的荧光信号分布于细胞膜、细胞质及细胞核,而 FGSG_03624-EGFP 融合蛋白的荧光只位于细胞外周区域,细胞质与细胞核内无信号(图 2)。综

上所述,推测 FGSG_03624 可能定位于细胞壁和/或细胞间隙,后续筛选其互作蛋白时使用核外双杂交系统——分裂泛素系统膜体系酵母双杂交进行。

2.2 重组诱饵表达载体的构建

重组诱饵载体 pBT3N-FGSG_03624、pBT3STE-FGSG_03624 和 pBT3SUC-FGSG_03624 的 PCR 扩增结果显示,在预期大小范围内均呈现单一扩增条带(726 bp/726 bp/672 bp)(图 3A)。经双酶切检测,pBT3N-FGSG_03624(*Pst* I/*Sac* II)、pBT3STE-FGSG_03624(*Xba* I/*Hind* III)和 pBT3SUC-FGSG_03624(*Xba* I/*Pst* I)分别产生与预期大小一致的小片段(722 bp、775 bp 和 717 bp)(图 3B)。送重组质粒测序,结果显示 FGSG_03624 已插入到载体的正确位置,读码框正确,无移码突变,表明重组诱饵载体构建成功。

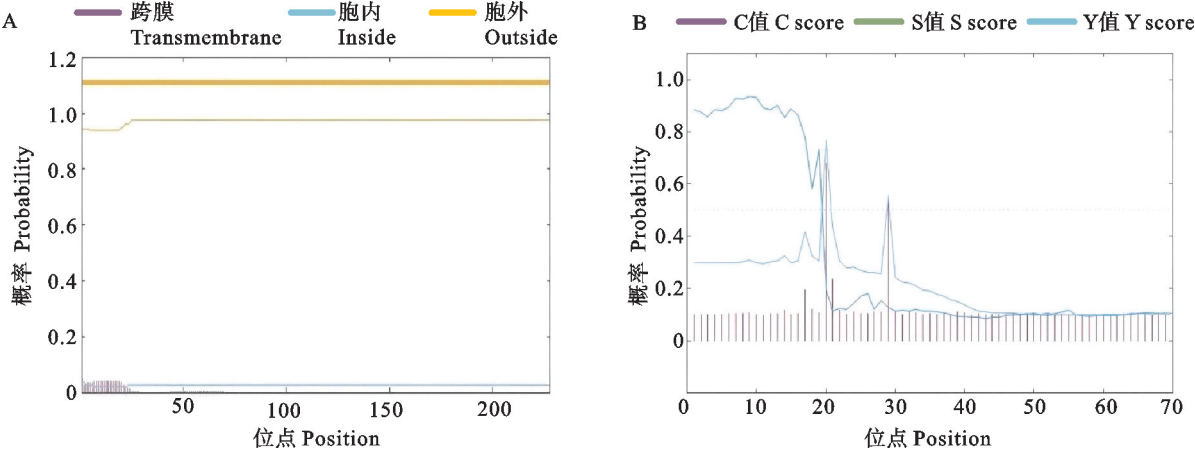


图 1 FGSG_03624 蛋白跨膜结构域(A)和信号肽(B)预测

Fig. 1 Prediction of FGSG_03624 protein transmembrane domain(A) and signal peptides(B)

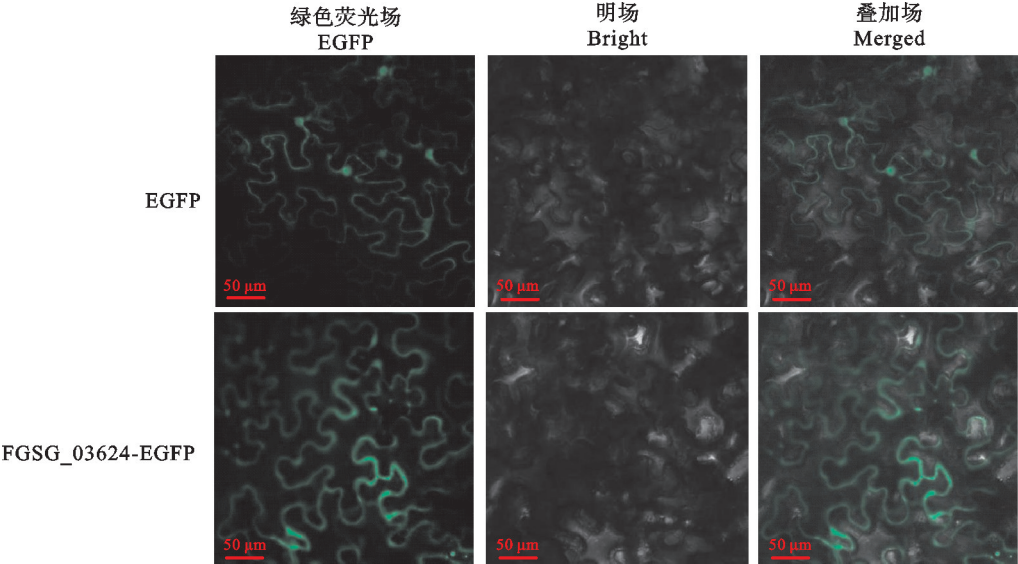


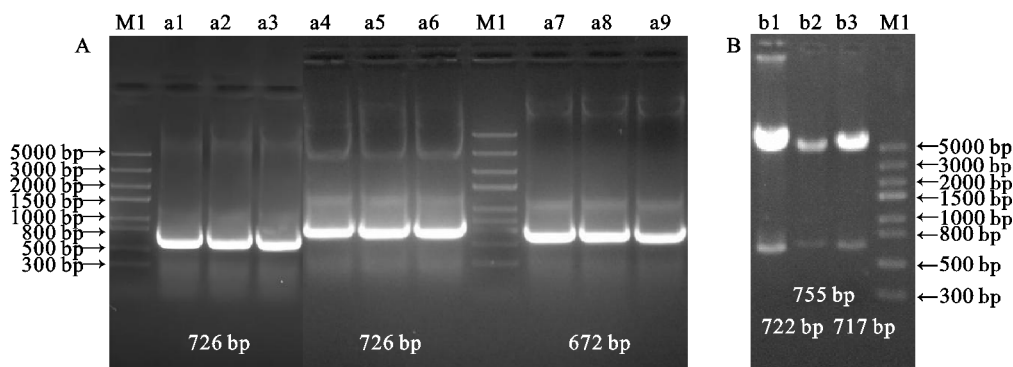
图 2 FGSG_03624 蛋白亚细胞定位

Fig. 2 Subcellular localization of FGSG_03624

2.3 重组诱饵表达载体的功能检测与自激活检测

重组诱饵载体 pBT3N-FGSG_03624、pBT3STE-FGSG_03624 和 pBT3SUC-FGSG_03624 分别与 pOst1-NubI 或 pPR3-N 共转化 NMY51 酵母细胞的转化子均能在 DDO 平板上正常生长(图 4), 说明转化成功。功能检测表明, 3 种重组诱饵载体与 pOst1-NubI 共转化后均能在 QDO/X/3-AT 平板上生长并显蓝色(图 4), 表明它们在 NMY51 酵

母细胞中均可表达并形成功能性融合蛋白。自激活检测结果显示, 在无 3-AT 条件下, 3 种重组诱饵载体与 pPR3-N 共转化后的菌落均能在 QDO/X 平板上生长且显蓝色, 表现出自激活活性(图 4); 当添加 12 mmol · L⁻¹ 3-AT 时, pBT3STE-FGSG_03624 的自激活被完全抑制(图 4)。因此, 后续选用 pBT3STE-FGSG_03624 作为诱饵载体, 并使用 12 mmol · L⁻¹ 3-AT 以消除自激活背景。

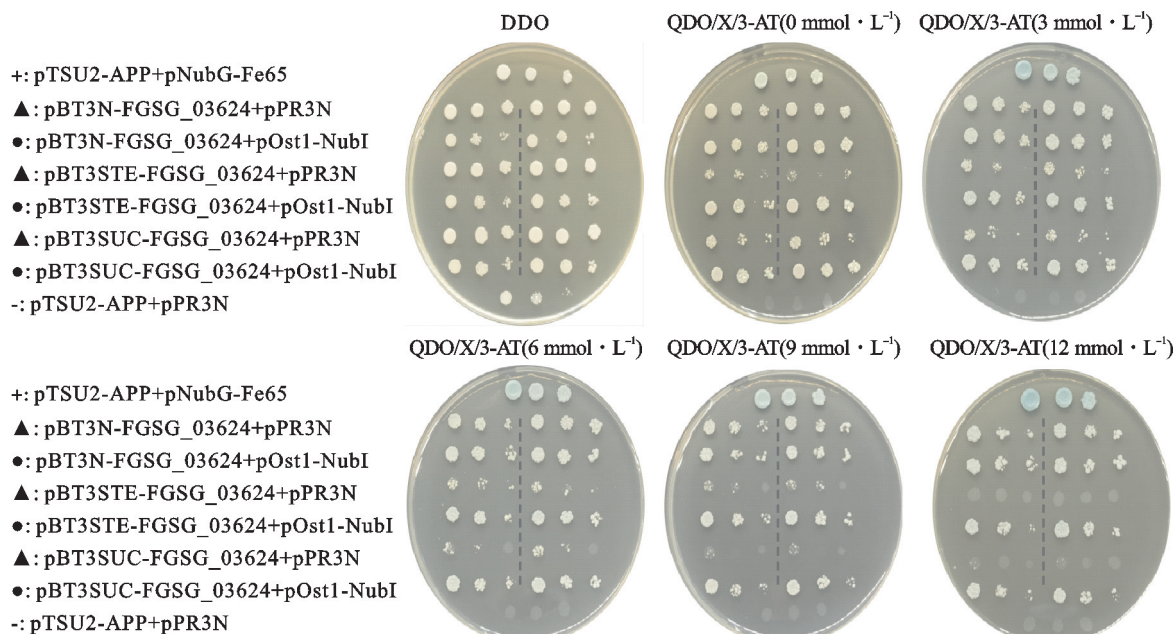


M1: Trans5K DNA marker; a1~a3: pBT3N-FGSG_03624; a4~a6: pBT3STE-FGSG_03624; a7~a9: pBT3SUC-FGSG_03624; b1: *Pst* I 和 *Sac* II 双酶切 pBT3N-FGSG_03624 载体; b2: *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切 pBT3STE-FGSG_03624 载体; b3: *Xba* I 和 *Pst* I 双酶切 pBT3SUC-FGSG_03624 载体。

M1: Trans5K DNA Marker; a1 — a3: PCR amplification of pBT3N-FGSG_03624; a4 — a6: pBT3STE-FGSG_03624; a7 — a9: pBT3SUC-FGSG_03624; b1: Digestion of pBT3N-FGSG_03624 with *Pst* I 和 *Sac* II; b2: Digestion of pBT3STE-FGSG_03624 with *Xba* I 和 *Hind* III; b3: Digestion of pBT3SUC-FGSG_03624 with *Xba* I 和 *Pst* I.

图 3 *FGSG_03624* 基因诱饵载体的 PCR 扩增(A)与重组诱饵载体的双酶切检测(B)

Fig. 3 PCR amplification of the *FGSG_03624* gene bait vector(A) and detection of recombinant vector by double enzyme digestion(B)



+: 阳性对照; -: 阴性对照; ▲: 自激活检测组; ●: 功能检测组; 虚线两侧为 2 个重复。

+: Positive control; -: Negative control; ▲: Self-activation detection group; ●: Function detection group. There are two repetitions on both sides of the dotted line.

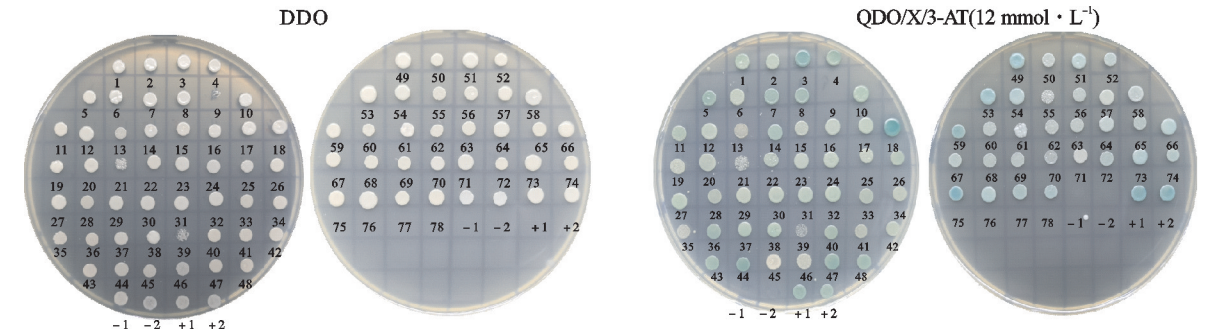
图 4 重组诱饵载体转化酵母功能检测与自激活检测

Fig. 4 Functional detection and self-activation detection of recombinant bait vector transformed yeast

2.4 FGSG_03624 互作蛋白的筛选与分析

采用分裂泛素系统膜体系酵母双杂交技术经 2 次筛选,共获得 77 个单克隆菌落(9 号未点成功)(图 5)。在复筛的 QDO/X/3-AT(12 mmol · L⁻¹)平板上挑取颜色较蓝的菌落,提取酵母质

粒,转入大肠杆菌 DH5α 进行克隆、测序。测序结果与中国春小麦参考基因组进行 Blast 比对,最终鉴定出 40 个候选互作蛋白(表 2)。功能注释分析显示,这些蛋白涉及转录调控、信号传导、胁迫响应、膜运输和植物-病原菌互作等(表 2)。



-1 和 -2: 阴性对照 pTSU2-APP+pPR3N 和 pBT3STE-FGSG_03624+pPR3N; +1 和 +2: 阳性对照 pTSU2-APP+pNubG-Fe65 和 pBT3STE-FGSG_03624+pOst1-NubI。
-1 and -2: Negative control pTSU2-APP+pPR3N and pBT3STE-FGSG_03624+pPR3N; +1 and +2: Positive control pTSU2-APP+pNubG-Fe65 and pBT3STE-FGSG_03624+pOst1-NubI.

图 5 木聚糖酶 FGSG_03624 互作蛋白的筛选
Fig. 5 Screening of candidate interacting protein for xylanase FGSG_03624

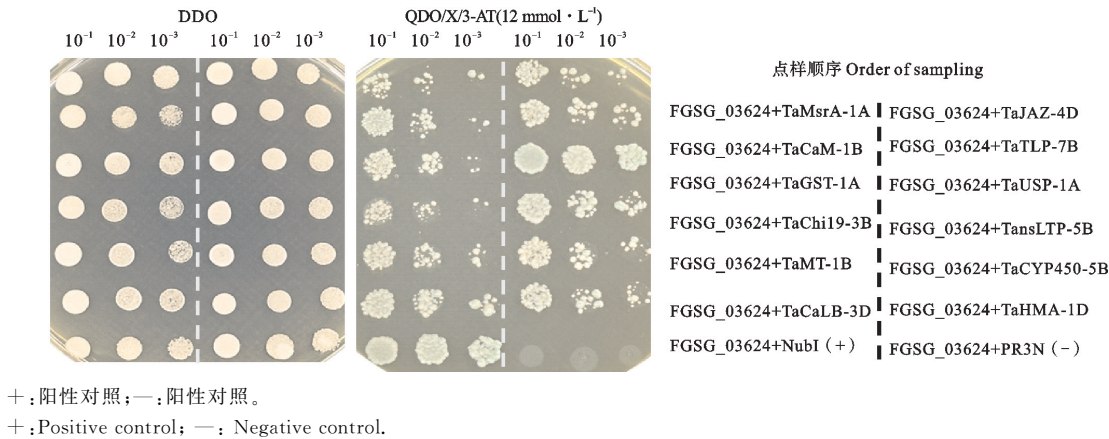
2.5 FGSG_03624 与候选互作蛋白回转验证

选择与信号传导、胁迫响应、植物-病原菌互作等相关的 12 个候选蛋白: 肽甲硫氨酸亚砷还原酶 MsrA (TaMsrA-1A)、钙调蛋白 (TaCaM-1B)、谷胱甘肽 s-转移酶 (TaGST-1A)、几丁质酶 (TaChi19-3B)、金属硫蛋白 (TaMT-1B)、钙依赖脂质结合 (CaLB 结构域) 家族蛋白 (TaCaLB-3D)、茉莉酸 ZIM 结构域蛋白 (TaJAZ-4D)、类甜蛋白 (TaTLP-7B)、通用应激蛋白 (TaUSP-1A)、非特异性脂质转运蛋白 (TansLTP-5B)、细胞色素 P450 (TaCYP450-5B) 以及重金属相关蛋白 (TaHMA-1D), 将对应的阳性克隆质粒 (pPR3N-候选蛋白基因) 与 pBT3STE-FGSG_03624 共转化

酵母菌株,进行酵母双杂交回转验证。结果显示, 12 个菌株和阳性对照 (FGSG_03624 + NubI) 在 QDO/X/3-AT (12 mmol · L⁻¹) 平板上均能生长并显示蓝色或淡蓝色, 而阴性对照 (FGSG_03624 + PR3N) 不能生长(图 6), 表明这 12 个候选蛋白与 FGSG_03624 在酵母细胞内存在互作关系。其中含 pBT3STE-FGSG_03624+pPR3-TaUSP-1A 的菌株生长状态最佳(仅次于阳性对照), 表明 FGSG_03624 与 TaUSP-1A 存在较强的互作关系。

2.6 FGSG_03624 与 TaUSP-1A 互作验证

荧光素酶互补实验 (LCA) 结果显示, 共注射 TaUSP-1A-nLUC 与 FGSG_03624-cLUC 的叶片区域产生强烈的荧光信号(图 7A), 而对照组 TaUSP-



+ : 阳性对照; - : 阳性对照。
+ : Positive control; - : Negative control.

图 6 木聚糖酶 FGSG_03624 与 12 个候选互作蛋白回转验证
Fig. 6 Validation of FGSG_03624 and twelve representative candidate proteins by Y2H assay

表 2 FGSG_03624 蛋白酵母双杂交筛选的候选互作蛋白
Table 2 Candidate interacting proteins by yeast two-hybrid screening of FGSG_03624

克隆编号 Clone ID	基因编号 Gene ID	注释 Annotation	功能 Function
1	TraesCS1A02G217300.1	肽甲硫氨酸亚砷还原酶 MsrA Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA	胁迫响应 Response to stress
14	TraesCS1B02G042200.1	金属硫蛋白 Metallothionein	
26/74	TraesCS5A02G092000.1/ TraesCS1A02G106600.1	通用应激蛋白 Universal stress protein	
30	TraesCS2B02G301600.1	重金属相关蛋白 Heavy metal-associated protein	
3	TraesCS3B02G293200.1	几丁质酶 Chitinase	病原菌侵染防御相关 Pathogeninfection defense related
20	TraesCS7B02G417700.1	类甜蛋白 Thaumatin-like protein	
24/76	TraesCS5B02G475500.1/ TraesCS1D02G050000.1	非特异性脂质转运蛋白 Non-specific lipid-transfer protein	
60	TraesCS1A02G079700.2	蛋白激酶家族 Kinase family protein	
72	TraesCS7D02G351300.1	几丁质酶 Chitinase	
43	TraesCS3A02G505200.1	线粒体导入内膜转位酶亚基 TIM16 Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM16	活性氧代谢 Activity of oxygen metabolism
53	TraesCS5B02G190600.1	细胞色素 P450 Cytochrome P450	
54	TraesCS6B02G364700.1	过氧化物酶体多功能酶 2 型 Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	
10/75/66	TraesCS1A02G186700.1/ TraesCS5B02G426400.1/ TraesCS7A02G034300.1	谷胱甘肽 s-转移酶 Glutathione S-transferase	
22,28/5/ 4,41,47	TraesCS3A02G404400.1/ TraesCS3B02G437900.1/ TraesCS3D02G399600.1	乙烯响应转录因子 Ethylene-responsive transcription factor	转录调控 Transcriptional regulation
8	TraesCS6A02G045100.1	BHLH 转录因子 BHLH transcription factor	
37	TraesCS5A02G468300.1	NAC 结构域连接蛋白 NAC domain-containing protein	
48	TraesCS7D02G269300.1	转录因子 Transcriptionfacto	
51	TraesCS1A02G298600.1	WRKY 转录因子 WRKY transcription factor	
12	TraesCS1B02G319400.1	钙调蛋白 Calmodulin	钙信号传导 Calcium signal transduction
17	TraesCS3D02G446700.2	钙依赖脂质结合(CaLB 结构域)家族蛋白 Calcium-dependent lipid-binding(CaLB domain) family protein	
18	TraesCS4D02G296000.1	茉莉酸 ZIM 结构域蛋白 Jasmonate ZIM domain protein	激素信号传导 Hormone signal transduction
6	TraesCS2A02G145500.1	转运蛋白颗粒复合物亚基 3 Trafficking protein particle complex subunit 3	膜运输 Membrane trafficking
31	TraesCS5A02G540700.1	跨膜蛋白 Transmembraneprotein	
40	TraesCS5B02G457700.1	囊泡相关膜蛋白 Vesicle-associated membrane protein	
7	TraesCS1A02G092900.1	40S 核糖体蛋白 S4 40S ribosomal protein S4	核糖体成分 Ribosomal components
32	TraesCS7A02G300500.1	60S 核糖体蛋白 L34 60S ribosomal protein L34	
27	TraesCS7D02G476800.1	丝氨酸/精氨酸重复基质蛋白 2 Serine/arginine repetitive matrix protein 2	剪接前 mRNA Alternative splicing pre-mRNA
49	TraesCS5A02G162800.2	FCA 蛋白 FCA protein	脂质生物合成蛋白 Lipid biosynthesis proteins
34	TraesCS2D02G397600.1	硫脂酶家族蛋白 Thioesterase family protein	
73	TraesCS3A02G394300.1	4-香豆酸:辅酶 a 连接酶样蛋白 4-coumarate:CoA ligase-like protein	脂类代谢 Lipid metabolism
44	TraesCS7A02G020600.1	SKP1-样蛋白质 SKP1-like protein	分解代谢过程 Catabolic process
42	TraesCS2A02G384700.1	烯醇酶 Enolase	糖酵解关键酶 Key enzymes of glycolysis
25	TraesCS3A02G303300.1	脂多糖出口系统渗透酶蛋白 LptF Lipopolysaccharide export system permease protein LptF	未知 Unknown

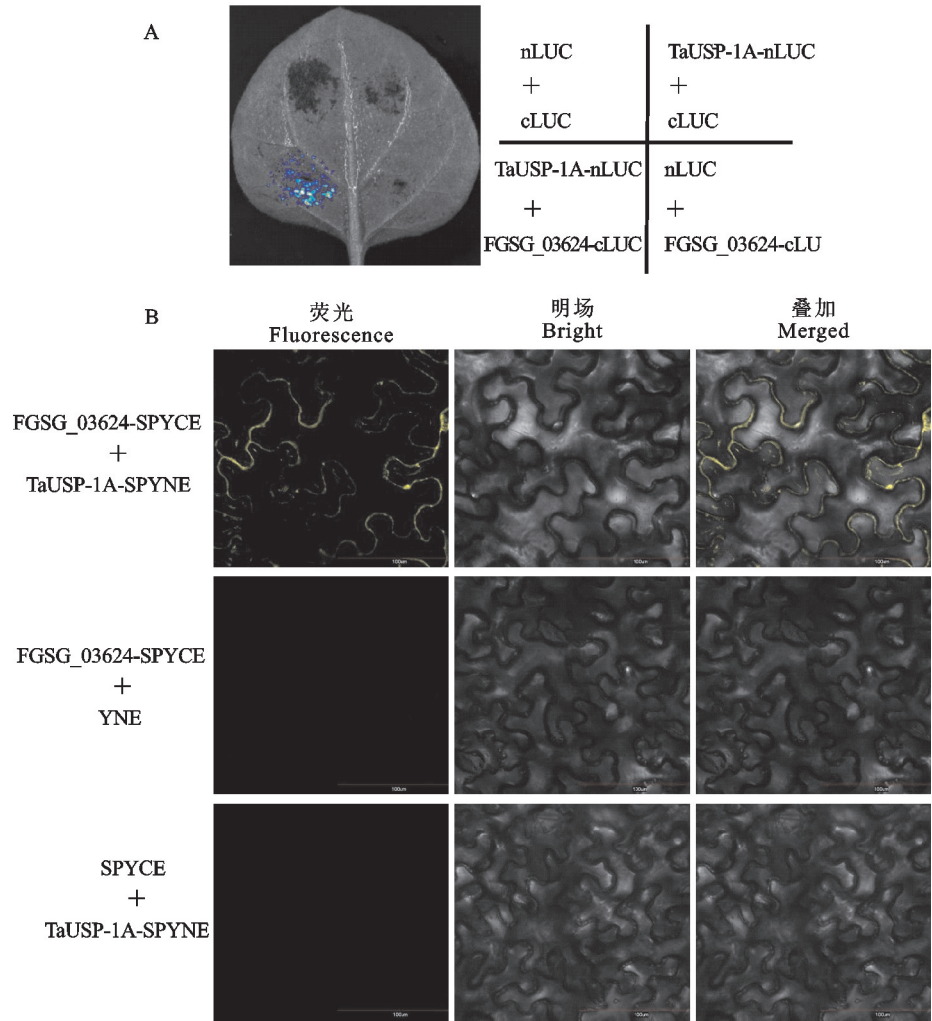


图 7 FGSG_03624 与 TaUSP-1A 的荧光素酶互补实验(A)和双分子荧光互补实验(B)验证
Fig. 7 Interaction between FGSG_03624 and TaUSP-1A detected by Luciferase complementation assay(A) and bimolecular fluorescence complementation assay(B)

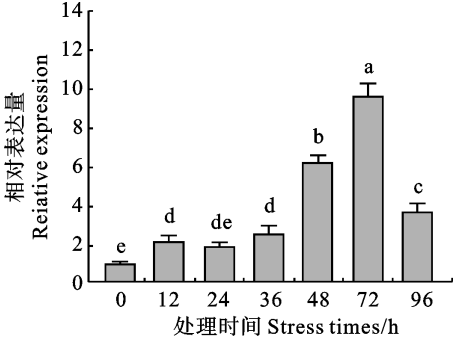
1A-nLUC+cLUC、nLUC+FGSG_03624-cLUC、nLUC+cLUC 均无显著荧光。双分子荧光互补 (BiFC) 实验结果显示,共表达 TaUSP-1A-SPYNE 与 FGSG_03624-SPYCE 的叶片细胞周围可检测到黄色荧光信号,而各阴性对照组 TaUSP-1A-SPYNE+SPYCE、SPYNE+FGSG_03624-SPYCE 均无荧光产生(图 7B)。上述结果进一步证实 FGSG_0362 与 TaUSP-1A 存在互作关系。

2.7 禾谷镰刀菌侵染小麦后TaUSP-1A 基因的表达

qRT-PCR 分析结果显示,安农 1589 小麦受禾谷镰刀菌侵染后,TaUSP-1A 的表达呈现先升后降的趋势,接种后的表达量均高于接种前(0 h)。在接种病原菌 72 h 时,TaUSP-1A 的表达量上升至最高(图 8),表明 TaUSP-1A 基因受禾谷镰刀菌的诱导上调表达,可能在小麦抵御禾谷镰刀菌侵染中发挥一定作用。

2.8 过表达TaUSP-1A 拟南芥的鉴定及其对禾谷镰刀菌的抗性

通过农杆菌 GV3101 介导的花序侵染法将 pHZM33-

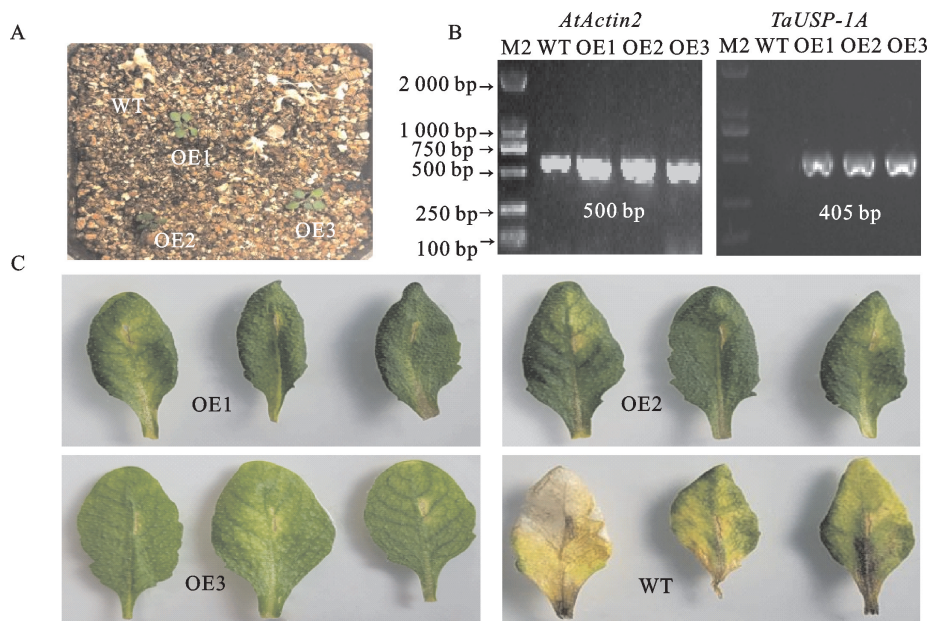


图柱上的不同小写字母表示 0.05 水平显著性差异。
Different letters on the columns mean significant difference at 0.05 level.

图 8 禾谷镰刀菌侵染下TaUSP-1A 基因的表达
Fig. 8 Expression of TaUSP-1A gene under F. graminearum infection conditions

TaUSP-1A 转化至拟南芥。喷施 Basta 后 3 个转基因株系(OE1—OE3)叶片仍保持绿色,而野生型(WT)植株则干枯死亡(图 9A)。RT-PCR 分析显示,所有株系均能检测到内参基因 $AtActin2$ 的表达,但仅转基因株系能特异性扩增出 $TaUSP-1A$ 条带(图 9B),表明 $TaUSP-1A$ 已成功整合并表达。

用离体叶片浸染法分别对 WT 和 OE1—OE3 株系接种禾谷镰刀菌,接种第 5 天时,WT 叶片的接菌部位相对于 OE1—OE3 株系叶片出现明显的黄色斑块,且病菌逐渐向周围蔓延(褐色)(图 9C),这表明过表达 $TaUSP-1A$ 能够提高拟南芥对禾谷镰刀菌的抗性。



A: 转基因拟南芥筛选; B: 过表达拟南芥的 RT-PCR 鉴定; C: 过表达拟南芥对禾谷镰刀菌的抗性鉴定; WT: 野生型拟南芥; OE1—OE3: $TaUSP-1A$ 基因过表达拟南芥; M2: Trans2K DNA marker。

A: Screening transgenic *Arabidopsis thaliana*; B: Identification of *Arabidopsis thaliana* lines overexpressing $TaUSP-1A$ by RT-PCR; C: Identification of resistance of *Arabidopsis thaliana* lines overexpressing $TaUSP-1A$ to *Fusarium graminearum*; WT: Wild-type *Arabidopsis thaliana*; OE1—OE3: Overexpression of the $TaUSP-1A$ gene in *Arabidopsis thaliana*; M2: Trans2K DNA marker.

图 9 $TaUSP-1A$ 基因过表达拟南芥的鉴定 (A、B) 及其对禾谷镰刀菌的抗性 (C)

Fig. 9 Identification of *Arabidopsis thaliana* lines overexpressing $TaUSP-1A$ (A and B) and resistance to *F. graminearum* (C)

3 讨论

木聚糖酶作为病原微生物分泌的关键因子,在侵染过程中具有双重作用:一方面通过降解木聚糖破坏植物细胞壁结构;另一方面作为病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 被植物模式识别受体 (pattern-recognition receptors, PRRs) 识别,进而激活 Ca^{2+} 内流、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 爆发、防御激素积累、胼胝质沉积以及防御相关基因表达等免疫反应^[16-17],这在绿色木霉乙炔诱导木聚糖酶 EIX 和灰葡萄孢菌木聚糖酶 BcXyl1 (xylanase 11) 与 Xyn11A 中已得到证实^[18-20]。本研究中,禾谷镰刀菌木聚糖酶 FGSG_03624 虽非致病所必需,但作为一种坏死因子,亦能诱导小麦组织坏死、活性氧积累和胼胝质沉积

等免疫反应,表明其同样可能作为 PAMP 参与激发植物免疫^[10,12]。

为进一步探究 FGSG_03624 激活小麦免疫反应的分子机制,本研究以 pBT3STE-FGSG_03624 为诱饵载体,利用分裂泛素系统膜体系酵母双杂交技术从禾谷镰刀菌感染的小麦穗部 cDNA 文库中筛选出 40 个可能与 FGSG_03624 互作的蛋白。部分候选蛋白属于病程相关蛋白,例如几丁质酶 (chitinase, Chi)、类甜蛋白 (thaumatin-like protein, TLP) 和非特异性脂质转移蛋白 (non-specific lipid-transfer protein, nsLTP) 等。研究表明,过表达大麦 (*Hordeum vulgare*) Class II 几丁质酶基因可增强小麦对禾谷镰刀菌的抗性^[21];小麦 $TaTLP1$ 能通过诱导 ROS 相关基因表达提升过表达植株对根腐病和叶锈病抗性^[22];本氏烟草 $NbLTP1$ 可通过激活 ROS 清除基因增

强过表达植株对烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)的抗性^[23]。还有一些候选蛋白参与胁迫响应,并与活性氧清除相关,如金属硫蛋白(metallothionein, MT)、谷胱甘肽转移酶(glutathione S-transferase, GST)和通用应激蛋白(universal stress protein, USP)等,它们可减轻自由基与 ROS 积累引发的细胞损伤,从而提高植物抗逆性^[24-26]。此外,本研究还筛选出关键信号组分,包括负责 Ca^{2+} 信号传导的钙调素(calmodulin, CAM)与茉莉酸信号通路抑制因子(jasmonate ZIM domain protein, JAZ)。已有报道表明,辣椒(*Capicum annuum*)CaCaM1 通过与 CaMLO2 互作负调控黄单胞菌(*Xanthomonas*)效应子 AvrBsT 触发的 Ca^{2+} 内流与细胞死亡^[27];而异源表达华东葡萄(*Vitis quinquangularis*)VqJAZ4 能够通过 SA/JA 信号通路增强拟南芥对白粉病的抗性^[28]。综上所述,FGSG_03624 可能与这些钙信号、JA 信号及 ROS 清除相关蛋白互作,通过整合信号传导与抗氧化防御过程,共同协调小麦对禾谷镰刀菌的防御反应。

4 结 论

禾谷镰刀菌木聚糖酶 FGSG_03624 属于位于细胞壁和/或细胞间隙的分泌蛋白,以 pBT3STE-FGSG_03624 为诱饵载体利用分裂泛素系统膜体系酵母双杂交技术从禾谷镰刀菌侵染的小麦穗部 cDNA 文库中共筛选到 40 个可能与 FGSG_03624 互作的蛋白,其功能涉及转录调控、信号传导、胁迫响应、膜运输和植物-病原菌互作等方面。酵母回转实验、荧光素酶互补实验和双分子荧光互补实验进一步验证了通用应激蛋白 TaUSP-1A 与 FGSG_03624 存在互作关系。并且 TaUSP-1A 受禾谷镰刀菌诱导上调表达,在拟南芥中过表达 TaUSP-1A 能够增强叶片的抗病性。本研究结果为后续深入解析 FGSG_03624 在致病过程中的作用机制,以及发掘小麦抗赤霉病基因资源提供了重要依据。

参考文献:

- [1]张爱民,阳文龙,李欣,等.小麦抗赤霉病研究现状与展望[J].遗传,2018,40(10):858.
ZHANG A M, YANG W L, LI X, et al. Current status and perspective on research against *Fusarium* head blight in wheat[J]. Hereditas, 2018, 40(10): 858.
- [2]曹淑琳,杨红福,冷苏凤,等.江苏省主推及新育成小麦品种抗赤霉病评价及毒素积累分析[J].麦类作物学报,2022,42(8):958.
CAO S L, YANG H F, LENG S F, et al. Identification of the resistance to *Fusarium* head blight and toxin accumulation of major wheat cultivars in Jiangsu Province [J]. Journal of Triticeae Crops, 2022, 42(8): 958.
- [3]王紫檀,李浩阳,赵文莎,等.小麦新品系的赤霉病抗性及其分子标记分析[J].麦类作物学报,2023,43(10):1273.
WANG Z T, LI H Y, ZHAO W S, et al. Resistance to *Fusarium* head blight and molecular marker analysis of new wheat lines [J]. Journal of Triticeae Crops, 2023, 43(10): 1273.
- [4]张琪琪,刘方方,万映秀,等.小麦新品系赤霉病抗性鉴定及基因效应分析[J].麦类作物学报,2024,44(5):567.
ZHANG Q Q, LIU F F, WAN Y X, et al. Identification of resistance to *Fusarium* head blight and gene effect analysis of new wheat lines [J]. Journal of Triticeae Crops, 2024, 44(5): 567.
- [5]KIKOT G E, HOURS R A, ALCONADA T M. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: A review [J]. Journal of Basic Microbiology, 2009, 49(3): 231.
- [6]PAPER J M, SCOTT-CRAIG J S, ADHIKARI N D, et al. Comparative proteomics of extracellular proteins *in vitro* and *in planta* from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum* [J]. Proteomics, 2007, 7(17): 3171.
- [7]BELIËN T, VAN C, VAN A, et al. Cloning and characterization of two endoxylanases from the cereal phytopathogen *Fusarium graminearum* and their inhibition profile against endoxylanase inhibitors from wheat [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 327(2): 407.
- [8]LIU Y, HAN N N, WANG S, et al. Genome-wide identification of *Triticum aestivum* xylanase inhibitor gene family and inhibitory effects of XI-2 subfamily proteins on *Fusarium graminearum* GH11 xylanase [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 665501.
- [9]陈红歌,刘艳芳,刘亮伟,等.木聚糖酶和木聚糖酶抑制蛋白在植物-病原菌互作中的作用[J].植物生理学通讯,2009,45(2):176.
CHEN H G, LIU Y F, LIU L W, et al. Roles of endoxylanases and their inhibitors in plant-phytopathogen interaction [J]. Plant Physiology Communications, 2009, 45(2): 176.
- [10]SELLA L, GAZZETTI K, FAORO F, et al. A *Fusarium graminearum* xylanase expressed during wheat infection is a necrotizing factor but is not essential for virulence [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 64: 1.
- [11]MOSCETTI I, FAORO F, MORO S, et al. The xylanase inhibitor TAXI-III counteracts the necrotic activity of a *Fusarium graminearum* xylanase *in vitro* and in durum wheat transgenic plants [J]. Molecular Plant Pathology, 2015, 16(6): 583.
- [12]TUNDO S, PACCANARO M C, BIGINI V, et al. The *Fusarium graminearum* FGSG_03624 xylanase enhances plant

- immunity and increases resistance against bacterial and fungal pathogens [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(19):10811.
- [13] 魏傲松, 李立群, 彭德, 等. 小麦 *TaPYL8* 基因的克隆与抗旱功能分析[J]. 麦类作物学报, 2024, 44(6):694.
- WEI A S, LI L Q, PENG D, *et al.* Cloning and drought resistance function analysis of wheat *TaPYL8* gene [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2024, 44(6):694.
- [14] 刘佳月, 郭树娟, 郑昊元, 等. 小麦 *TaGFL4m* 基因的克隆及其盐胁迫响应分析[J]. 麦类作物学报, 2022, 42(4):391.
- LIU J Y, GUO S J, ZHENG H Y, *et al.* Cloning and functional analysis of *TaGFL4m* gene under salt stress in wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2022, 42(4):391.
- [15] 邢 瑾, 崔百明. AtEDR3 介导拟南芥对小麦禾谷镰刀菌的作用[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2013, 31(4):397.
- XING J, CUI B M. AtEDR3 mediating activity to *Fusarium graminearum* in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Shihezi University (Natural Science)*, 2013, 31(4):397.
- [16] ENKERLI J, FELIX G, BOLLER T. The enzymatic activity of fungal xylanase is not necessary for its elicitor activity [J]. *Plant Physiology*, 1999, 121(2):391.
- [17] 邓一文, 刘裕强, 王 静, 等. 农作物抗病虫研究的战略思考[J]. 中国科学:生命科学, 2021, 51(10):1435.
- DENG Y W, LIU Y Q, WANG J, *et al.* Strategic thinking and research on crop disease and pest resistance in China [J]. *Scientia Sinica (Vitae)*, 2021, 51(10):1435.
- [18] RON M, AVNI A. The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato [J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(6):1604.
- [19] YANG Y K, YANG X F, DONG Y J, *et al.* The *Botrytis cinerea* xylanase BcXyl1 modulates plant immunity [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9:2535.
- [20] FRÍAS M, GONZÁLEZ M, GONZÁLEZ C, *et al.* A 25-residue peptide from *Botrytis cinerea* xylanase BcXyn11A elicits plant defenses [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10:474.
- [21] SHIN S, MACKINTOSH C A, LEWIS J, *et al.* Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(9):2371.
- [22] CUI Z C, LIANG F, ZHANG J R, *et al.* Transgenic expression of *TaTLPI*, a thaumatin-like protein gene, reduces susceptibility to common root rot and leaf rust in wheat [J]. *The Crop Journal*, 2021, 9(5):1214.
- [23] ZHU F, CAO M Y, ZHU P X, *et al.* Non-specific lipid transfer protein 1 enhances immunity against tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2023, 74(17):5236.
- [24] 赵良侠, 琚唐丹, 熊 蕾, 等. 非生物胁迫下植物金属硫蛋白基因调控的研究进展[J]. 植物生理学报, 2022, 58(10):1801.
- ZHAO L X, JU T D, XIONG L, *et al.* Research advances on gene regulation of metallothionein in plants under abiotic stress [J]. *Plant Physiology Journal*, 2022, 58(10):1801.
- [25] UGALDE J M, LAMIG L, HERRERA-VÁSQUEZ A, *et al.* A dual role for glutathione transferase U7 in plant growth and protection from methyl viologen-induced oxidative stress [J]. *Plant Physiology*, 2021, 187(4):2451.
- [26] CHI Y H, KOO S S, OH H T, *et al.* The physiological functions of universal stress proteins and their molecular mechanism to protect plants from environmental stresses [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10:750.
- [27] SUNG K, WOO C, KOOK H. Pepper mildew resistance locus O interacts with pepper calmodulin and suppresses *Xanthomonas* AvrBsT-triggered cell death and defense responses [J]. *Planta*, 2014, 240(4):827.
- [28] ZHANG G F, YAN X X, ZHANG S L, *et al.* The jasmonate-ZIM domain gene *VqJAZ4* from the Chinese wild grape *Vitis quinquangularis* improves resistance to powdery mildew in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 143:329.