

水稻烯酰辅酶 A 水合酶的功能预测分析

单崇蕾, 山草梅, 陈兰兰, 况卫刚, 林桠春, 张连虎*, 崔汝强*

江西农业大学农学院, 江西南昌 330045

摘要: 水稻潜根线虫是一类寄生于水稻根部的迁移性内寄生线虫, 广泛分布于各类水稻田中, 成为严重危害水稻的寄生线虫, 其中水稻细尖潜根线虫是江西省最严重的水稻潜根线虫之一。目前培育抗病品种是防治水稻潜根线虫病最为经济、有效的措施。通过转录组分析水稻细尖潜根线虫侵染的和未受水稻细尖潜根线虫的感病水稻品种‘霸王鞭’根组织基因表达情况, 筛选出差异常表达显著上调基因 *OsECH1*, 并对 *OsECH1* 蛋白及其同源蛋白进行系统发育分析。结果表明: *OsECH1* 蛋白与其他同源蛋白具有相同的保守结构域 PLN02874, 属于 ECH 家族。同时发现在水稻‘日本晴’中有 5 个同源基因, 其中 *OsECH1* 基因位于染色体 1 上; 克隆获得 *OsECH1* 基因全长并利用同源重组技术构建重组表达载体, 通过农杆菌转化获得转基因水稻; 经 RT-qPCR 分析该基因表达水平对水稻细尖潜根线虫侵染的影响。结果表明, 在水稻中过表达 *OsECH1* 基因会减少水稻细尖潜根线虫的侵染, 沉默 *OsECH1* 基因会增加水稻细尖潜根线虫的侵染; *OsECH1* 蛋白亚细胞定位于细胞核中; 通过 His-tag pull down 分析, 该蛋白可能与 5 种防御相关蛋白互作。5 种防御相关蛋白分别属于 vATP-synt_E 家族蛋白、Ricin-B 家族蛋白、过氧化氢酶和 B_lectin 家族。RT-qPCR 结果表明 *OsECH1* 对这 5 种蛋白均具有调控作用, 该结果为进一步揭示 *OsECH1* 基因的功能提供基础。上述结果不仅为了解 *OsECH1* 基因的分子机制奠定基础, 也为进一步阐述水稻与潜根线虫的互作机制提供新方向。

关键词: 水稻潜根线虫; 烯酰辅酶 A 水合酶; 抗病基因

中图分类号: S511 文献标识码: A

Functional Prediction Analysis of Enoyl-CoA Hydratase in Rice

SHAN Chonglei, SHAN Caomei, CHEN Lanlan, KUANG Weigang, LIN Yachun, ZHANG Lianhu*, CUI Ruqiang*

School of Agricultural Sciences, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China

Abstract: *Hirschmanniella* spp. are migratory endoparasitic nematodes which are parasitic in the root of rice. They are widely distributed in different types of fields and have become serious parasitic nematodes to rice. The plant-parasitic nematode *Hirschmanniella mucronata* is one of the most serious rice nematodes in Jiangxi, China. At present, breeding and planting other disease-resistant varieties is the most economical and effective measure to control the disease. The significant up-regulated *OsECH1* gene was screened by transcriptome analysis of healthy susceptible rice ‘Bawangbian’ root tissues and susceptible rice ‘Bawangbian’ root tissues infected by *H. mucronata*. Phylogenetic analysis of *OsECH1* and its homologous proteins showed that *OsECH1* and other homologous proteins had the same structure, including the same conserved domain PLN02874. And *OsECH1* belonged to the ECH protein family. Besides, five homologous genes were found in the genome of ‘Nipponbare’ group and *OsECH1* was located in Chr1. The full length of *OsECH1* was cloned and the recombinant expression vector was constructed by homologous recombination technique. Meanwhile, the transgenic rice was transformed by GV1301. RT-qPCR was used to analyze the effect of *OsECH1* gene expression level on the infection of *H. mucronata* in rice. The results showed that overexpressing *OsECH1* in rice could reduce the infection of *H. mucronata*, while silencing *OsECH1* in rice could significantly increase the infection of *H. mucronata*. The results of subcellular localization of *OsECH1* showed that the protein was expressed in nucleus. And the results of

收稿日期 2022-05-25; 修回日期 2022-06-14

基金项目 国家自然科学基金地区基金项目 (No. 32060607)。

作者简介 单崇蕾 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物病理学。*通信作者 (Corresponding author): 张连虎 (ZHANG Lianhu), E-mail: zhanglianhu0328@163.com; 崔汝强 (CUI Ruqiang), E-mail: cuiruqiang@jxau.edu.cn。

His-tag pull down demonstrated that the protein may interacted with five defence-related proteins. The five defence-related proteins belonged to vATP-synt_E protein family, Ricin-B protein family, catalase and B_lectin protein family respectively. Meanwhile, RT-qPCR results showed that OsECH1 had regulatory effects on the five proteins. The results would provide a basis for further understanding the function of *OsECH1* gene, and for understanding the molecular mechanism of *OsECH1*.

Keywords: *Hirschmanniella mucronate*; enoyl-CoA hydratase; disease-resistant gene

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.03.003

水稻是世界上最重要的农作物之一, 全球超过一半以上的人口以水稻为主食^[1]。为满足人口增长需要, 据预测, 至 2030 年, 水稻产量需要增加至少 25%。随着测序技术的快速发展及基因组的易操作性, 水稻已经成为一种重要的模式生物, 用以研究植物性状及与病原微生物的互作。水稻生产中受到多种病原物的影响, 寄生线虫是一类最具经济破坏性的植物病原体之一, 每年导致全球产量损失 1730 亿美元, 因此, 防控线虫病害是水稻生产中的一项重要工作^[2-3]。

水稻潜根线虫是一类寄生于水稻根部的迁移性内寄生线虫, 该线虫在世界水稻种植区如欧洲、亚洲和非洲等地均有被发现, 分布极其广泛^[4-6]。在我国水稻种植区, 如广东、湖南、湖北、江西、福建等地, 均发现有潜根线虫的为害^[6]。水稻潜根线虫利用其口针刺穿水稻细胞, 进入根表皮细胞, 在根表皮细胞中取食迁移, 造成细胞机械损伤。线虫的侵染会导致表皮细胞坏死, 破坏皮层细胞, 导致皮层和坏死区出现空洞, 根部腐烂并呈现黄褐色; 地上部分的为害表现为水稻伸长迟缓、株高降低、分蘖延迟、产量降低^[7]。已有研究报道发现, 有 11 种潜根线虫可成功侵染水稻, 其中水稻细尖潜根线虫是危害江西省水稻种植最严重的寄生线虫^[4, 8]。

在本研究前期工作中, 已对来自世界各地的 560 个水稻品种进行水稻潜根线虫的抗性鉴定, 并从中筛选出易感水稻品种‘霸王鞭’(R155), 同时对接种线虫的‘霸王鞭’(RN155)和未接种线虫的‘霸王鞭’(R155)进行了转录组测序^[7]。结果发现‘霸王鞭’品种中编码烯酰辅酶 A 水合酶(enoyl-CoA hydratase, *OsECH1*)的一个基因 *Os01g0752200* (LOC4324637) 表达量显著上调, 因此, 该基因是否参与细尖潜根线虫的侵染, 加强或降低水稻的抗病性是一个非常值得研究的问题。鉴于此, 本研究以 *OsECH1* 基因作为研究对象, 对其结构特点、亚细胞定位及互作蛋白进行

初步分析。同时获得 *OsECH1* 基因的过表达及基因沉默的转基因水稻, 进一步明确 *OsECH1* 基因的功能, 为进一步研究水稻抗潜根线虫的分子机理提供新方向。

1 材料与方法

1.1 材料

‘日本晴’水稻种子、过表达载体 pCAMBIA-1302、原核载体 pET28a、分子伴侣 pTf16、农杆菌 GV3101、大肠杆菌感受态 DH5 α 、水稻细尖潜根线虫均为本实验室保存。RNAi 载体 pBWA(V)HS 及转基因水稻由武汉伯远生物科技有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 *OsECH1* 生物信息学分析 在 NCBI 中进行 BlastP 搜索 *OsECH1* 在各种模式植物中的同源蛋白。选取的序列有黍 (*Panicum hallii*, XP 025814293.1)、柳枝稷 (*Panicum virgatum*, XP 039849084.1)、小米 (*Setaria italica*, XP 004969966.1)、玉米 (*Zea mays*, NP 001150290.1)、高粱 (*Sorghum bicolor*, XP 002458497.1)、短柄草 (*Brachypodium distachyon*, XP 003567122.1)、籼稻 (*Oryza sativa* Indica Group, EEC 71489.1)、大麦 (*Hordeum vulgare* subsp. *Vulgare*, XP 044977061.1) 和小麦 (*Triticum aestivum*, XP 044341339.1, XP 044357827.1, XP 044350069.1)。根据得到的 *OsECH1* 的同源蛋白, 利用 MEGA 7.0 软件采用最大似然法 (maximum likelihood) 构建系统发育树, 并进行 1000 次的 bootstrap 的分析验证。利用在线软件 MEME 进行 motif 分析 (<https://meme-suite.org/meme/tools/streme>); 在 NCBI 中进行蛋白结构域的预测分析 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>); 在 NCBI 中对‘日本晴’基因组文件下载, 并完成对‘日本晴’中 ECH 家族的基因定位 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>)。利用在线软件 EXPASY

对 OsECH1 蛋白的理化性质进行分析 (<https://web.expasy.org/protparam/>); 利用在线软件 EXPASY-ProtScale 对 OsECH1 蛋白的亲疏水性进行分析 (<https://web.expasy.org/protscale/>); 通过 NetPhos 3.1 Server 预测 OsECH1 蛋白氨基酸序列的磷酸化位点情况 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>)。

1.2.2 水稻材料的生长条件 水稻种子在 28 °C 的无菌水中发芽 3 d 后, 移栽至营养土中 (营养土壤: 珍珠岩: 蛭石=3:1:1), 并在人工气候培养箱中培养, 设置气温范围为 28~30 °C, 相对湿度范围为 85%~90%。

1.2.3 水稻 RNA 制备和 RT-qPCR 分析 利用 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) 试剂盒提取水稻根总 RNA, 利用 EasyScript[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix (TRAN) 试剂盒合成 cDNA。在 CFX[™] 96 Real-Time PCR detection system (Bio Rad) 中进行实时定量 PCR, 使用 PerfectStart Green qPCR SuperMix[®] (TRAN) 完成 RT-qPCR, 其引物序列见表 1, 并使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析数据^[9]。

表 1 本研究所用引物

Tab. 1 Prime sequences used in this study

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
OsECH1-qpF	GAAGGGAGCATTGATGGAAA
OsECH1-qpR	TGCTTCCGACCTTCTCTGAT
OS-Actin-F	AGGCTCCTCTCAACCCCAAG
OS-Actin-R	TTCCTGGTCATAGTCCAGG
03g-F	ATCGTGCTCTGGGAGTGGG
03g-R	CCTTGATGCTGTTGCTGTGCC
06g-F	ACAGTTTGACAGGGAGCG
06g-R	GGGTCTGAACACCAGGAGC
07g-F	TCGTGCTCTGGGAGTGGTG
07g-R	CCTGATCTTGTTGCTGTGCC
01g-F	TGTCAGCCACAACCACC
01g-R	CCAGCACAACACCTCCA
09g-F	TGTTCCGTGCCACTTATCC
09g-R	GCTCGACACCCTCTGTCTC
Hm-Actin-F	CCTTTGTACACACCGCCCGT
Hm-Actin-R	GCCAACGTTAGCCGTACCCA

1.2.4 OsECH1 亚细胞定位 构建 pCAMBIA1302-OsECH1-GFP 载体用于亚细胞定位。使用电转法将质粒转入根癌农杆菌菌株 GV3101 感受态中; 转化完成后, 将转化的细菌在含有抗生素 LB 培

养基中于 28 °C 培养过夜; 次日, 取 1 mL 过夜菌液以 1:100 的比例扩大培养, 直至菌液在 $OD_{600}=1\sim 1.5$, 使用 MES 缓冲液 (10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L MES, pH 5.6) 收集菌体重悬 3 次并将悬浮液调整至 $OD_{600}=0.25\sim 0.5$; 将悬浮液注射至水稻原生质体中, 并将材料在黑暗培养中保持 24~48 h, 最后使用激光共聚焦显微镜观察亚细胞定位的荧光信号。

1.2.5 OsECH1 互作蛋白的获得 将没有信号肽序列的 OsECH1 蛋白的编码区插入至 pET28a 载体中, 并将其转入至含有 pTf16 的感受态细胞中 (本实验室保存)。构建成功的表达菌株于 37 °C 涂布培养, 并挑取单菌落扩大培养至 $OD_{600}=0.6\sim 0.8$ 。加入 IPTG 诱导, 超声后分别吸取上清、菌体, 加入 6×protein loading buffer 煮沸, 进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。对重组蛋白的表达条件优化后进行大量表达, 用于后续蛋白纯化。利用 ProteinIso[®] Ni-NTA Resin 试剂盒获得纯化蛋白, 所有步骤均按照说明书进行。诱导表达纯化和浓缩的蛋白与水稻根总蛋白孵育互作完成后, 使用 290 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱互作蛋白, 然后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测。蛋白质质谱检测由武汉金开瑞生物工程有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 OsECH1 蛋白的生物信息学分析

根据水稻‘霸王鞭’接种细尖潜根线虫的转录组数据分析, 结果发现一个编码烯酰辅酶 A 水合酶 (enoyl-CoA hydratase, *OsECH1*) 的基因 *Os01g0752200* (LOC4324637) 在线虫侵染水稻时, 表达量明显上调。从图 1 可看出, 水稻‘霸王鞭’在被细尖潜根线虫侵染时, *OsECH1* 基因的表达量明显提高, 说明该基因响应细尖潜根线虫的侵染。

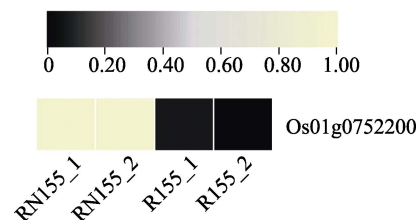


图 1 *OsECH1* 基因的表达量热图分析

Fig. 1 Heat map showing expression of *OsECH1* gene

利用 *OsECH1* 蛋白序列在水稻基因组中的序列比对分析, 结果发现水稻基因组中有 5 个同源基因, *OsECH1* 基因位于 Chr1 (染色体 1) 上 (图

2)。对来自其他 8 个物种中的 *OsECH1* 同源蛋白进行序列比对和系统发育分析，结果表明，*OsECH1* 与籼稻 (*Oryza sativa* Indica Group, EEC

71489.1) 更相似。此外，这些同源蛋白均具有相同的基序和保守结构域，这表明 *OsECH1* 蛋白具有烯醇辅酶 A 水合酶活性 (图 3)。

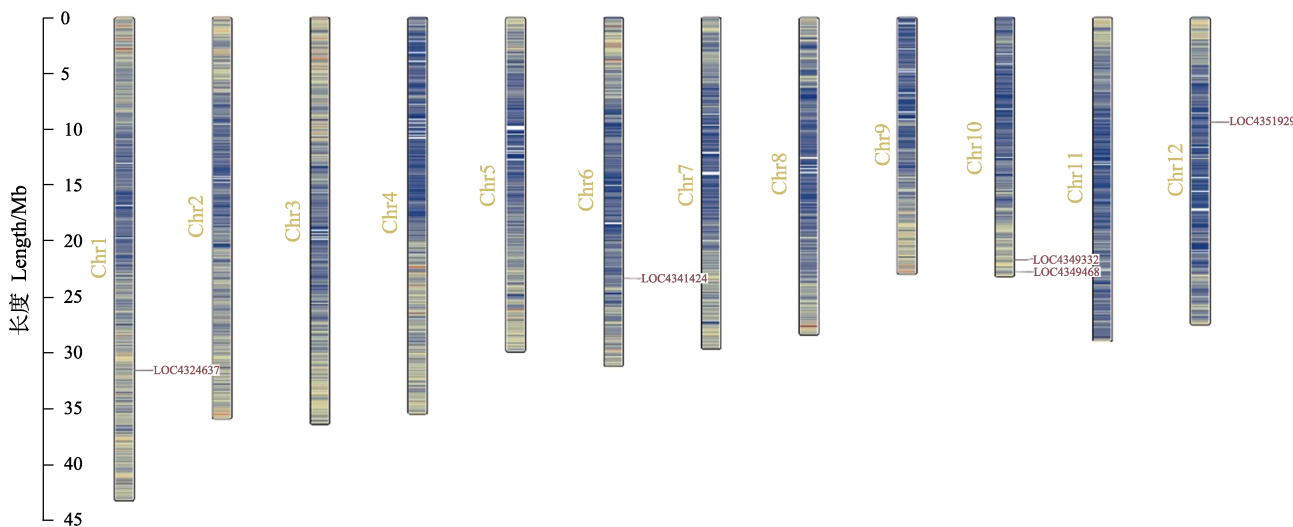


图 2 ‘日本晴’水稻基因组中 *OsECH1* 基因的定位
Fig. 2 Gene location of *OsECH1* genome in rice Nipponbare

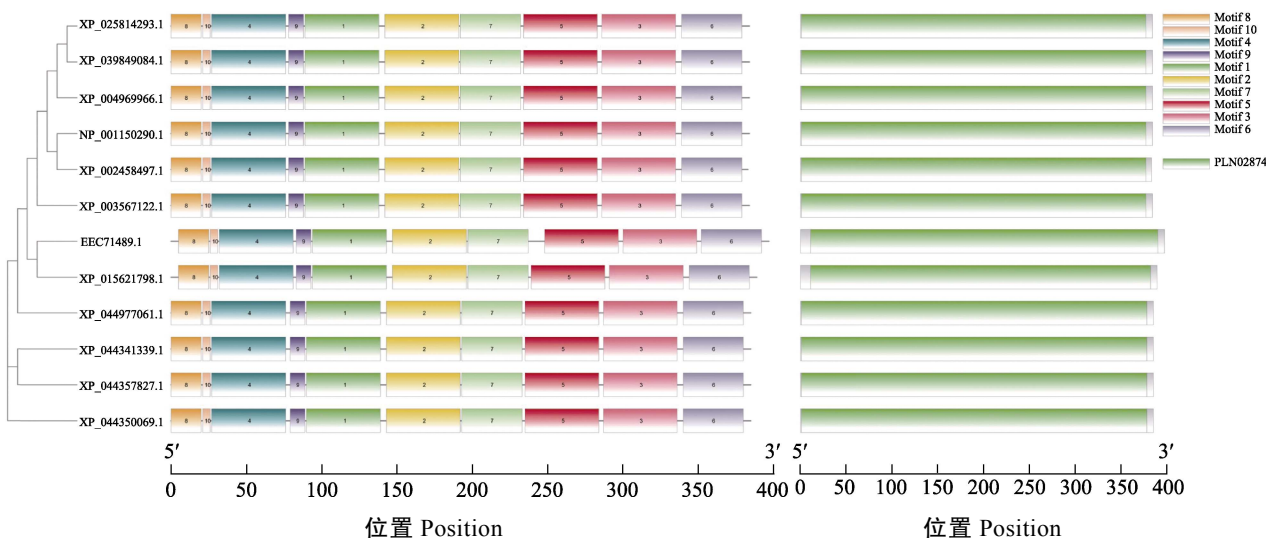


图 3 *OsECH1* 蛋白系统的发育与进化分析
Fig. 3 Development and evolution of *OsECH1* protein system

2.2 *OsECH1* 蛋白的理化性质分析

利用 DNAMAN 8 软件对 *OsECH1* 基因序列及其编码氨基酸序列进行分析，结果显示，该基因 ORF 为 1170 bp，编码 389 个氨基酸。利用在线软件 ExPASy-ProtParam tool 分析 *OsECH1* 蛋白的氨基酸组成及理化性质，结果表明，该蛋白分子式为 $C_{1915}H_{3029}N_{517}O_{595}S_{15}$ ，相对分子质量为 43.30 kDa，理论 pI 为 5.15，脂肪系数为 84.50，该蛋白有 159 个疏水性氨基酸，230 个亲水性氨基酸，84 个酸性氨基酸，51 个碱性氨

基酸 (图 4)。

2.3 *OsECH1* 蛋白的亲疏水性分析

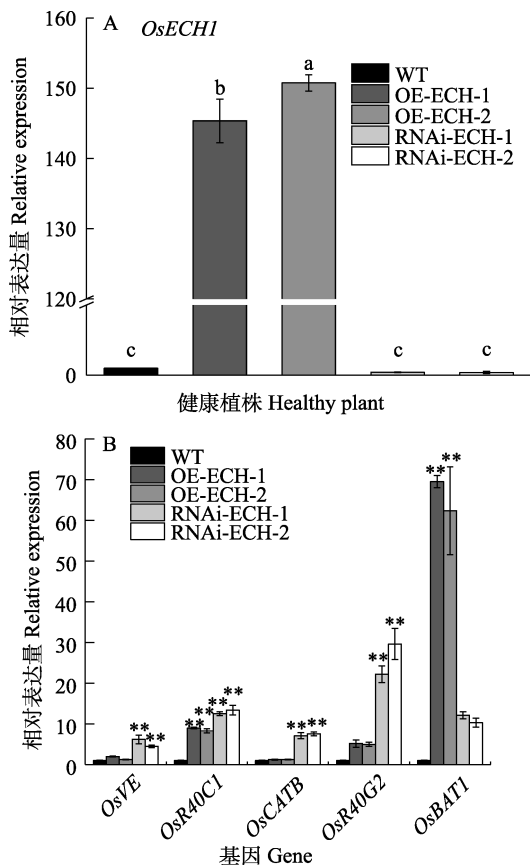
借助软件 ProtScale 分析 *OsECH1* 蛋白的亲/疏水性，结果显示，最大值为 -2.75，最小值为 2.25，总平均亲水性 (GRAVY) 为 -0.316，表明 *OsECH1* 蛋白为亲水性肽链 (图 5)。

2.4 *OsECH1* 蛋白的磷酸化位点分析

OsECH1 蛋白含有丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr) 和酪氨酸 (Tyr) 磷酸化位点数分别为 26 个、14 个和 3 个 (图 6)。

水稻中显著减少，在 OE-ECH 水稻中显著增强。表明已成功获得了 *OsECH1* 基因的过表达和基因沉默转基因水稻（图 8A）。

为了研究 *OsECH1* 基因与 5 个蛋白之间的关系，分别分析其在 3 种水稻中的表达量变化情况。RT-qPCR 结果显示，*OsVE*、*OsCATB*、*OsR40G2* 基因的表达量在 RNAi-*OsECH1* 水稻中显著上调，*OsBAT1* 基因的表达量在 OE-*OsECH1* 水稻中显著上调，*OsR40C1* 基因在 RNAi-*OsECH1*、OE-*OsECH1* 水稻中均显著上调（图 8B）。以上结果表明，*OsECH1* 基因对这 5 个蛋白具有调控作用，为后续探究 *OsECH1* 基因的功能提供新思路。



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$),
**表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$),
** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

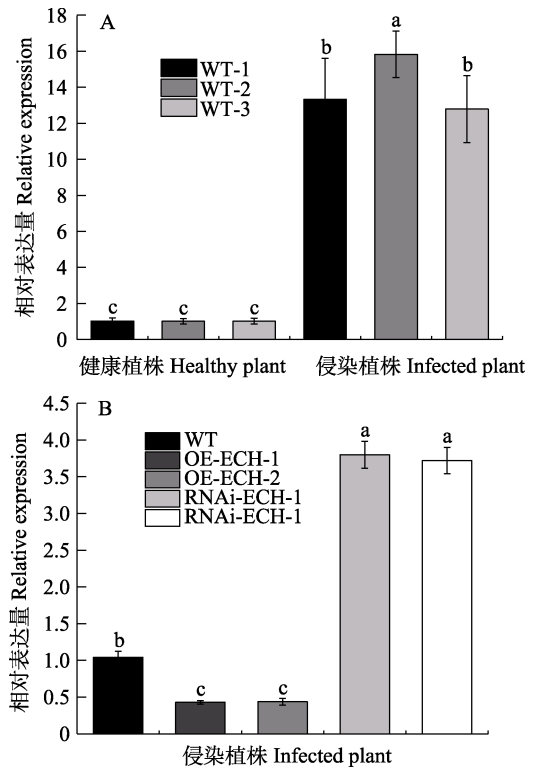
图 8 *OsECH1* 基因在健康植株 (A) 及不同转基因水稻 (B) 中的表达分析

Fig. 8 Expression analysis of *OsECH1* gene in healthy plants (A) and different transgenic rice (B)

2.8 *OsECH1* 蛋白影响细尖潜根线虫的侵染

为了验证转录组分析结果，比较 *OsECH1* 基因在健康的野生型‘日本晴’(WT)与受侵染的

野生型‘日本晴’中的表达水平(图 9A)。*OsECH1* 基因在受侵染的 WT 水稻根部中表达较高(12%~15%)。通过比较 3 种水稻中细尖潜根线虫基因的表达量变化，发现与 WT 水稻相比，在 RNAi-*OsECH1* 水稻中细尖潜根线虫的侵染量增加，但在 OE-*OsECH1* 水稻中细尖潜根线虫的侵染量减少(图 9B)。结果再次表明 *OsECH1* 蛋白可能在植物与细尖潜根线虫的互动中起作用。



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 9 *OsECH1* 基因在不同转基因水稻中的表达分析
Fig. 9 Expression analysis of *OsECH1* gene in different transgenic rice

3 讨论

目前，水稻病害日益严重，尤其是植物寄生线虫病。随着水稻中植物寄生线虫抗性基因的分离和克隆技术的快速发展，极大地促进了植物与线虫之间互动的研究，更有利于防治植物线虫病。虽然关于线虫效应子的研究越来越多，但关于水稻潜根线虫的研究较少。通过研究线虫效应子寻找水稻抗病基因一直是一个研究热点。廖金铃和卓侃团队发现了根结线虫效应子 *MgMO289* 靶向水稻铜金属伴侣 *OsHPPO4* 抑制水稻的方位反应，以影响植物免疫并促进侵染，这是首次发现植物

病原物利用植物超氧阴离子降解系统清除活性氧,从而抑制植物免疫反应^[11]。虽然在寄主植物中已经成功克隆了一些抗线虫基因,但其抗性机制尚不清楚,并且寄主植物与线虫的相互作用模型尚未建立。因此,线虫效应子与抗性基因蛋白相互作用的研究将有助于进一步研究寄主植物-寄生线虫相互作用的机制。

前期研究表明,烯酰辅酶 A 水合酶 (ECH) 属于水合酶/异构酶家族,并且 ECH 在不同物种中序列同源性非常高^[12-13]。ECH 是脂肪酸 β 氧化过程中不可缺少的酶,ECH 的异常代谢会导致脂肪酸代谢紊乱^[14]。因此,酰辅酶 A 水合酶在生命活动中有着非常重要的作用。目前,ECH 的功能在哺乳动物中被广泛研究,而在植物中的研究较少。已有研究证明水稻中的 ECH 与 MAP1 相互作用,MAP 蛋白与稻瘟病的防治有关,从而证明 ECH 可能为稻瘟病的防治提供新的方向^[15]。编码烯酰辅酶 A 合成酶的 *ACTT5*、编码烯酰辅酶 A 水合酶 *ACTT6* 是葡萄孢白僵菌柑橘致病型中活性毒素生物合成的必需基因^[16]。

本研究在日本晴根部 cDNA 中克隆出 *OsECH1* 基因并获得其纯化蛋白。通过 His-tag pull down 实验发现 5 种蛋白与 *OsECH1* 互作,包括 vATP-synt_E 家族蛋白、Ricin-B 家族蛋白、过氧化氢酶 (CAT) 和 B_lectin 家族蛋白,而这些家族均已经被证明与防御相关。

OsR40C 家族于 1997 年由 MOONS 等^[17]首次报道,*OsR40C1* 和 *OsR40G3* 的表达水平在盐处理的水稻根中显著上调。CAT 在植物生长发育、胁迫防御反应、氧化衰老等生理过程中发挥着重要作用。研究表明,脱落酸 (ABA) 通过诱导水分胁迫下水稻叶片中的 *OsCATB* 控制 H_2O_2 积累^[18]。低温、干旱、氧化应激、水杨酸 (SA) 和 ABA 可诱导拟南芥中 *CAT1*、*CAT2* 和 *CAT3* 基因的表达和 CAT 酶活性^[19]。V-ATPase 酶对植物生长和发育至关重要。研究发现细胞中的 V-ATPase 酶参与植物对寒冷、盐分和重金属胁迫的反应。高盐和低温胁迫可以诱导 V-ATPase 酶的结构和数量发生变化,从而提高个体植物对环境变化的适应性,减少逆境对个体植物的伤害^[20]。拟南芥的 V-ATPase 酶的 a、e 和 g 亚基也可被高盐胁迫诱导,这表明 V-ATPase 酶在应激反应中存在潜在功能^[21]。植物凝集素广泛分布于动物、植物和微生物中,现在已发现 1000 多种植物凝集素,它已

被公认是高表达蛋白,在水稻中已经发现了 1100 个基因^[22]。植物凝集素可以特异性结合糖类,在植物防御反应中发挥重要作用^[23]。*Pi-d2* 是水稻中的一种 G 型凝集素受体激酶,主要功能是参与抗稻瘟病^[24]。*OsLecRK* 不仅参与调控水稻种子萌发,而且在抗病性方面也发挥着重要作用。敲除该基因可抑制抗病基因的表达,从而降低水稻对真菌和细菌病原菌及害虫的抗性^[25]。这些结果为进一步研究 *OsECH1* 的功能提供了新思路。通过分析 *OsECH1* 基因的功能,可增加对 ECH 家族功能的理解,进一步分析 *OsECH1* 蛋白及互作蛋白的功能,有助于探究抗潜根线虫侵染的作用机理。

参考文献

- [1] GANIE S A, BHAT J A, DEVOTO A. The influence of endophytes on rice fitness under environmental stresses[J]. *Plant Molecular Biology*, 2022, 109: 447-467.
- [2] ABAD P, GOUZY J, AURY J M, SERENO P C, DANCHIN E G J, DELEURY E, BARBOECH L P, ANTHOUARD V, ARTIGUENAVE F, BLOK V C, CAILLAUD M C, COUTINHO P M, DASILVA C, LUCA F D, DEAU F, ESQUIBET M, FLUTRE T, GOLDSTONE J V, HAMAMOUCHE N, HEWEZI T, JAILLON O, JUBIN C, LEONETTI P, MAGLIANO M, MAIER T R, MARKOV G V, MCVEIGH P, PESOLE G, POULAIN J, RECHAVI M R, SALLET E, SÉGURENS B, STEINBACH D, TYTGAT T, UGARTE E, GHELDER C V, VERONICO P, BAUM T J, BLAXTER M, ZACHEO T B, DAVIS E L, EWBANK J J, FAVERY B, GRENIER E, HENRISSAT B, JONES J T, LAUDET V, MAULE A G, QUESNEVILLE H, ROSSO M N, SCHIEX T, SMANT G, WEISSENBACH J, WINCKER P. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(8): 909-915.
- [3] RUTTER W B, FRANCO J, GLEASON C. Rooting out the mechanisms of root-knot nematode-plant interactions[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2022, 12(16): 3-34.
- [4] BRIDGE J, PLOWRIGHT R A, PENG D. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agric-culture[M]. London: CAB International, 2005.
- [5] MICHAEL J, CLAUDE B, DAVID C, THIERRY C, ELISAVET C, KATHARINA D S, GIANNI G, JEAN CLAUDE G, JOSEP A, JAQUES M, ALAN M, MARIA N N, STEPHEN P, ROEL P, TROND R, VITTORIO R, GREGOR U, ARIENA V B, WOPKE V W, JONATHAN W, STEPHAN W, TOMASZ K, BJÖRN N. Pest categorisation

- of *Hirschmanniella* spp.[J]. EFSA Journal, 2018, 16(6): 5297-5328.
- [6] 何晋, 刘淑婷, 陈淳, 丁善文, 谢辉, 徐春玲. 基于 rDNA-ITS 序列建立 LAMP 检测水稻潜根线虫的方法[J]. 植物病理学报, 2021, 51(4): 626-635.
- HE J, LIU S T, CHEN C, DING S W, XIE H, XU C L. A loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Hirschmanniella oryzae* based on rDNA-ITS sequences[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2021, 51(4): 626-635. (in Chinese)
- [7] SUN X T, ZHANG L, TANG Z Q, MA J, CUI R Q. Transcriptome analysis of roots from resistant and susceptible rice varieties infected with *Hirschmanniella mucronata*[J]. FEBS Open Bio, 2019, 9(11): 1968-1982.
- [8] ELLING A A. Major emerging problems with minor meloidogyne species[J]. Phytopathology, 2013, 103(11): 1092-1102.
- [9] SCHMITTGEN T, LIVAK K J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. Methods, 2002, 4(25): 402-408.
- [10] HOGLUND A, DONNES P, BLUM T, ADOLPH H W, KOHLBACHER O. MultiLoc: prediction of protein subcellular localization using N-terminal targeting sequences, sequence motifs and amino acid composition[J]. Bioinformatics, 2006, 22(10): 1158-1165.
- [11] SONG H D, LIN B, HUANG Q L, SUN L H, CHEN J S, HU L L, ZHUO K, LIAO J L. The *Meloidogyne graminicola* effector MgMO289 targets a novel copper metallochaperone to suppress immunity in rice[J]. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(15): 5638-5655.
- [12] AGNIHOTRI G, LIU H W. Enoyl-CoA hydratase. reaction, mechanism, and inhibition[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2003, 11(1): 9-20.
- [13] WONG B J, GERLT J A. Evolution of function in the crotonase superfamily: (3S)-methylglutaconyl-CoA hydratase from *Pseudomonas putida*[J]. Biochemistry, 2004, 43(16): 4646-4654.
- [14] HILTUNEN J K, MURSULA A M, ROTTENSTEINER H, WIERENGA R K, KASTANIOTIS A J, GURVITZ A. The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2003, 27(1): 35-64.
- [15] CUI X, WEI Y, WANG Y H, LI J, WONG F L, ZHENG Y J, YAN H, LIU S S, LIU J L, JIA L B, ZHANG S H. Proteins interacting with mitochondrial ATP-dependent Lon protease (MAP1) in *Magnaporthe oryzae* are involved in rice blast disease[J]. Molecular Plant Pathology, 2015, 16(8): 847-859.
- [16] MIYAMOTO Y, ISHII Y, HONDA A, MASUNAKA A, TSUGE T, YAMAMOTO M, OHTANI K, FUKUMOTO T, GOMI K, PEEVER T L, AKIMITSU K. Function of genes encoding acyl-CoA synthetase and enoyl-CoA hydratase for host-selective act-toxin biosynthesis in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*[J]. Phytopathology, 2009, 99(4): 369-377.
- [17] MOONS A, GIELEN J, VANDEKERCKHOVE J, STRAETEN D V D, MONTAGU G M V. An abscisic-acid- and salt-stress-responsive rice cDNA from a novel plant gene family[J]. Planta, 1997, 202(4): 443-454.
- [18] YE N H, ZHU G H, LIU Y G, LI Y X, ZHANG J H. ABA controls H₂O₂ accumulation through the induction of *Os-CATB* in rice leaves under water stress[J]. Plant & Cell Physiology, 2011, 52(4): 689-698.
- [19] YANG T, POOVAIAH B W. Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calciu-m/calmodulin[J]. Proceedings of National Academy of Sciences, 2002, 99(6): 4097-4102.
- [20] SCHUMACHER K, KREBS M. The V-ATPase: small cargo, large effects[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2010, 13(6): 724-730.
- [21] HANITZSCH M, SCHNITZER D, SEIDEL T, DORTJE G, GOLLDACK D, DIETZ K J. Transcript level regulation of the vacuolar H⁺-ATPase subunit isoforms VHA-a, VHA-E and VHA-G in *Arabidopsis thaliana*[J]. Molecular Membrane Biology, 2007, 24(5-6): 507-518.
- [22] PEUMANS W J, DAMME V E J. Lectins as plant defense proteins[J]. Plant Physiology, 1995, 109(2): 347-352.
- [23] CONINCK T D, DAMME V E J M. Review: the multiple roles of plant lectins[J]. Plant Science, 2021, 313: 111096.
- [24] CHEN X W, SHANG J J, CHEN D X, LEI C L, ZOU Y, LIU G Z, XU J C, LIANG Z Z, CAO G, MA B T, WANG Y P, ZHAO X F, LI S G, ZHU L H. Erratum: A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance[J]. The Plant Journal, 2006, 46(5): 794-804.
- [25] CHENG X Y, WU Y, GUO J P, DU B, CHEN R Z, ZHU L L, HE G C. A rice lectin receptor-like kinase that is involved in innate immune responses also contributes to seed germination[J]. The Plant Journal, 2013, 76(4): 687-698.