

拟南芥免疫相关基因启动子对免疫信号分子的响应强度分析

罗箫 甘爽 谢国莉 郭晋雅 蔡易*

(四川农业大学 生命科学学院,四川 雅安 625014)

摘要 为对比不同的植物抗病相关基因对植物免疫激发子的响应强度,筛选出响应强度较高的报告基因,从拟南芥中克隆5个植物免疫相关基因(*WRKY33*、*FRK1*、*WRKY29*、*PR2*和*PDF1.2*)的启动子序列,构建目的基因启动子驱动的荧光素酶(Luciferase,LUC)表达载体,并将其转化到拟南芥原生质体中瞬时表达;经植物免疫激发子(FLG22与PEP1)处理后,进行LUC活性检测,判断目的基因启动子的激活情况,分析上述目的基因启动子对免疫信号分子的响应强度。结果显示:经FLG22与PEP1处理后,拟南芥原生质体细胞中*WRKY33*响应强度为最高,与对照相比分别上调11.2与4.5倍,*WRKY29*响应强度次之,分别为对照的10.0与3.1倍;与*WRKY*相比,*FRK1*响应强度明显降低,而*PR2*与*PDF1.2*均无明显响应。上述结果表明在拟南芥原生质体瞬时表达体系中*WRKY33*可高效响应植物免疫激发子,*pWRKY33*;LUC原生质体表达体系可作为一种高效的PTI反应报告系统,用于新型植物免疫激发子的筛选鉴定。

关键词 拟南芥;植物免疫;报告基因;信号响应强度

中图分类号 S432.2+3

文章编号 1007-4333(2019)06-0010-07

文献标志码 A

Analysis of the response intensity of *Arabidopsis* immune-related gene promoters to the immune signaling molecules

LUO Xiao, GAN Shuang, XIE Guoli, GUO Jinya, CAI Yi*

(College of Life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract In order to compare the response intensity of different plant resistance genes to plant immune elicitors and screen reporter gene with high response intensity, the promoters of 5 plant immune related genes (*WRKY33*, *FRK1*, *WRKY29*, *PR2* and *PDF1.2*) were cloned from *Arabidopsis thaliana* in this study. Luciferase expression vectors driven by target gene promoters were constructed and transformed into *Arabidopsis* protoplasts for transient expression. After the treatment with plant immune elicitors (FLG22 and PEP1), LUC activity was detected to determine the activation of the target promoters, and the response intensity to immune signal molecules was analyzed. The results showed that after treatment with FLG22 and PEP1, the response intensity of *WRKY33* in *Arabidopsis* protoplasts was the highest, which was 11.2 times and 4.5 times higher than that of control, respectively. It was followed by that of *WRKY29*, which was 10.0 times and 3.1 times more respectively; Compared with *WRKY*, the response intensity of *FRK1* was significantly lower, but neither *PR2* nor *PDF1.2* displayed apparent response. The above results indicated that *WRKY33* efficiently responded to plant immune elicitors in the protoplast transient expression system of *Arabidopsis* and the *pWRKY33*; LUC protoplast expression system could be used as a highly efficient PTI reaction reporting system for the screening and identification of novel plant immune elicitors.

Keywords *Arabidopsis thaliana*; plant immunity; report gene; signal response intensity

收稿日期: 2018-05-28

基金项目: 四川省杰出青年基金项目(2016JQ0009)、四川省教育厅高校科研创新团队项目(16TD0005)、四川省教育厅一般项目(17ZB0330)

第一作者: 罗箫, 硕士研究生, E-mail: scxyxiao@sina.com

通讯作者: 蔡易, 教授, 主要从事植物免疫研究, E-mail: yicai@sicau.edu.cn

病原微生物对植物的侵袭会严重影响植物的生长和发育,造成农业生产上农作物大面积减产。因此揭示病原菌侵染植物的分子机制和植物启动自身免疫抵抗病原菌的侵染,对于现代农业生产具有重要的指导意义。已有研究表明,植物可以依靠细胞膜表面模式识别受体(Pattern recognition receptors, PRRs)识别病原菌相关分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)启动 PAMPs 触发免疫反应(PAMP-triggered immunity, PTI)^[1-2]。PTI 反应作为植物免疫的第一层防御机制,它通过模式识别受体识别 PAMPs,例如细菌鞭毛蛋白、脂多糖、真菌的葡聚糖和几丁质等,迅速触发基础免疫,包括超敏(HR)反应、活性氧爆发(ROS)、胼胝质的沉积和丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)的活化、植物抗毒素的产生以及一些抗病相关基因的表达,最终阻止病原菌的入侵^[3-7]。PTI 反应可以帮助植物抵抗大部分的病原微生物,对病原微生物的抗性具有持久性和广谱性。

在众多已鉴定的 PAMPs 中,研究最为深入的是细菌鞭毛蛋白(flagellin)N 段的 22 个保守氨基酸序列—FLG22。1999 年 Felix 及其助手发现鞭毛蛋白的 N 端片段具有诱导植物免疫的活性,并合成了一段基于丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)鞭毛蛋白序列保守区域 22 个氨基酸的多肽,该多肽可以刺激植物生成活性氧(ROS),诱导病程相关基因表达,胼胝质的沉积等防御反应。对 FLG22 功能的进一步研究发现,FLG22 的 C 末端部分的 15 个氨基酸序列 FLG15,仍然能激活番茄的免疫反应,但不能激活拟南芥的免疫反应^[8-9]。Gomez 等^[10]从对 FLG22 不敏感的拟南芥突变体中图位克隆获得一个具有胞外富含亮氨酸重复(Leucine rich repeat, LRR)结构域的一类受体激酶(Receptor like kinase, RLK)家族成员基因 *FLS2*。Chinchilla 等^[11]通过受体-配体结合分析证实 *FLS2* 为 FLG22 的受体。

除外源 PAMPs 外,植物本身也会分泌一些物质作为损伤相关分子模式(Damage associated molecular patterns, DAMPs),植物细胞膜表面受体在识别 DAMPs 后也可触发 PTI 反应。Huffaker 等^[12]首次从拟南芥叶片中发现一种 DAMP 分子 PEP1(*AtPEP1*)。*AtPEP1* 是一个仅有 23 个氨基酸的小肽,在拟南芥中该家族共有 8 个成员,在病原菌诱导或 PAMP 处理后该家族 3 个成员 PEP1、PEP2

和 PEP3 均有表达^[12]。通过与 *AtPEP1* 的同源序列比对在玉米中找到了 1 个同源基因—*ZmPEP1*,其编码的 *ZmPEP1* 也具有诱导玉米 PTI 反应的活性^[13-14]。进一步研究发现,*AtPEPs* 在细胞膜表面的 LRR-RLK 受体为 PEPR1 和 PEPR2^[15-16],PEP1 与 PEP2 能被 *PEPR1* 和 *PEPR2* 共同识别,PEP1 被 PEPR2 单独识别^[15]。PEPs 被细胞膜受体 PEPR 识别后,引起 BAK1 和 BIK1 的磷酸化,激活细胞膜的钙离子通道,从而触发 PTI 下游免疫反应^[17-19]。

由信号分子触发的植物免疫反应,是免疫信号通路中一系列基因表达的结果,大量的免疫相关基因参与其中^[8-9,13-14]。*FRK1* (*FLG22-INDUCED RECEPTOR-LIKE KINASE 1*) 是目前公认的 PTI 途径的标志性报告基因,其表达受 *FLG22* 的诱导^[7]。在茉莉酸(Jasmonic acid, JA)途径中 *PDF1.2* 是其通路的标志基因。研究发现,*PDF1.2* 基因特异地受 JA 和乙烯(Ethylene, ETH)的调控,参与植物抗病反应^[19]。另一研究较为广泛的植物免疫相关基因是 *PR* 家族成员。植物受病原物侵袭时会诱导 *PR* 表达,其与植物系统获得性抗性(Systemic acquired resistance, SAR)和系统诱导性抗性(Induced systemic resistance, ISR)的建立密切相关^[20]。*WRKY* 家族转录因子在植物免疫信号的传导中也发挥着重要的作用^[21]。例如,拟南芥 *AtWRKY29* 是 MAPK 蛋白介导的植对病原的防御反应的重要组成部分,其在拟南芥中的瞬时表达,能增强其对丁香假单胞菌的抗性^[22]。*WRKY33* 同样参与了植物免疫信号途径:在没有病原菌侵染的情况下 *WRKY33* 会与 MPK4 形成复合体^[23],该复合体依赖于 MPK 底物 MKS1,当植物被病原菌感染,复合体被激活, MKS1 磷酸化, MPK4-MKS1-*WRKY33* 复合体被破坏, *WRKY33* 被释放,激活 *PAD3* 表达,催化合成植保素(Camalexin),用于抵抗病原菌侵袭^[24]。

在植物抗病免疫的研究中,常常需要通过检测已知免疫相关基因的表达情况来反映植物免疫信号通路的激活情况。筛选出能够灵敏、高效地响应免疫信号分子的报告基因,对于筛选植物抗病激酶以及深入探讨植物抗病分子机制的研究鲜有报道。本研究从拟南芥中克隆 5 个植物免疫相关基因(*WRKY33*、*FRK1*、*WRKY29*、*PR2* 和 *PDF1.2*)的启动子序列,构建目的基因启动子驱动的荧光素酶

(Luciferase, LUC)表达载体,并将其转化到拟南芥原生质,经植物免疫激发子(FLG22与PEP1)处理后,进行LUC活性检测,分析上述目的基因启动子的激活情况以及对免疫信号的响应强度,旨在对比不同的植物抗病相关基因对植物免疫激发子的响应强度,以期筛选出响应强度较高的报告基因,用于检测植物抗病反应中植物免疫信号通路的激活情况。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以拟南芥 *Col-0* 为材料,种子 4 °C 春化后点种于育苗盆中,以 Jiffy 营养土作为培养基质,在温度 22 °C、湿度 40%、光照 90 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、12 h 光照/12 h 黑暗条件下培养 4 周后,用于基因组 DNA 提取及叶肉原生质体制备。

1.2 试验方法

将 5 个植物免疫相关基因 *FRK1*、*PR2*、*PDF1.2*、*WRKY33* 和 *WRKY29* 的启动子序列分别与 *LUC* 编码序列融合,构建瞬时表达载体 *Promoter::LUC*。将各基因 *Promoter::LUC* 载体与 *35S::GUS*(内参载体)一起转化到拟南芥 *Col-0* 叶肉细胞原生质体中共表达。分别用外源病原菌 PAMP FLG22 与植物内源 DAMP PEP1 处理后,通过对 LUC 和 GUS 活性进行定量检测。

1.2.1 拟南芥基因组 DNA 的提取

采用 Omega 试剂盒从 4 周龄的拟南芥 *Col-0* 叶片中提取基因组 DNA,根据 Genbank 中目的基因的上游序列设计特异性引物(表 1),以基因组 DNA 为模板,克隆上述免疫相关基因的启动子序列 *pFRK1*、*pPR2*、*pPDF1.2*、*pWRKY33* 和 *pWRKY29*。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	基因库号 GenBank accession No.	引物序列(5'—3') Primer sequence (5'—3')
<i>BamH</i> I-pFRK1- <i>Nco</i> I	AT2G19190	F:CCTGCAGGCTCTAGAGGATCCCTGACAGTGAACCTTCATTGTTCAAGC R:TGTTTTTGGCGTCTTCCATGGGCTGCTTCTCTGGGCTAGAGC
<i>BamH</i> I-pPR2- <i>Nco</i> I	AT3G57260	F:CCTGCAGGCTCTAGAGGATCCGCCGAACCAATATTCTATCAAGG R:TGTTTTTGGCGTCTTCCATGGTTTTCTTGATTTTTCTATGATTCTGT GAA
<i>BamH</i> I-pPDF1.2- <i>Nco</i> I	AT5G44420	F:CCTGCAGGCTCTAGAGGATCCTCTACCAAAAATCTTTGGTGCTTG R:TGTTTTTGGCGTCTTCCATGGGATGATTATTACTATTTTTGTTTTCC AATGTATAG
<i>BamH</i> I-pWRKY33- <i>Nco</i> I	AT2G38470	F:CCTGCAGGCTCTAGAGGATCCCGCTGCTTTTTTCGAGATAGATAGAT R:TGTTTTTGGCGTCTTCCATGGACGAAAAATGGAAGTTTTGTTTTAT AAA
<i>BamH</i> I-pWRKY29- <i>Nco</i> I	AT4G23550	F:CCTGCAGGCTCTAGAGGATCCCAATGAAAACACAAGAAGTCAAGA ACC R:TGTTTTTGGCGTCTTCCATGGATAAGCCACCTCACCCATATATCTCTC

1.2.2 载体构建

使用 Vazyme ClonExpress II One Step Cloning 重组克隆试剂盒,将目的启动子序列克隆到表达载体 *HBT95::LUC* 中,构建成目的基因启动子驱动

的 *LUC* 瞬时表达载体(图 1)。

1.2.3 拟南芥原生质体瞬时转化

从 4 周龄的拟南芥 *Col-0* 叶片中提取原生质体,采用 PEG 介导的原生质体转化法^[26],在 100 μL

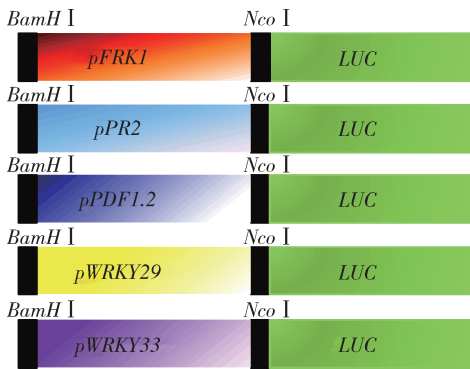


图 1 Promoter::LUC 瞬时表达载体的构建

Fig. 1 Construction of Promoter::LUC transient expression vectors

原生质体中按照一定的比例,加入目的基因启动子驱动的 LUC 瞬时表达载体 Promoter::LUC 与内参表达载体 35S::GUS 的质粒共 10 μ L (Promoter::LUC : 35S::GUS 体积比 7 : 3),轻微震荡混匀后,加入等体积 PEG-Ga 介导转化。转化完成后,分别向各原生质体样品中加入 1 μ mol/L flg22 及 1 μ mol/L pep1 进行处理,并以加入等体积的 H₂O 处理作为阴性对照,在温度 22 $^{\circ}$ C、相对湿度 40%、光照 40 μ mol/(m²·s) 的条件下培养 12 h 后,在 440 r/min 的转速下离心收集原生质体。

1.2.4 拟南芥原生质体瞬时转化效率检测

单独转化 HBT95::GFP 载体到原生质体中,培养 12 h 后,取样品检测转化效率。通过荧光显微镜观察转化后的原生质体细胞中 GFP 荧光的表达情况,并统计同一视野内表达 GFP 荧光的细胞个数与细胞总数之比,计算转化效率。

1.2.5 酶活性的定量分析

加入裂解液 (Tris-phosphate 25 mmol/L, DTT 1mmol/L, DCTA 2 mmol/L, Glycerol 10%, v/v, Triton 1%, v/v) 裂解原生质体细胞后,采用美国 Promega 公司的 LUC 检测试剂盒,购于与 Sigma 公司的 GUS 检测试剂盒处理,使用酶标仪对 LUC 和 GUS 的活性进行测定,每个处理共设置 3 个生物学重复,每次试验进行 3 次技术重复。

1.2.6 数据处理与分析

将测定的 LUC 酶活性数值与 GUS 酶活性数值按下列公式计算目的基因启动子驱动下 LUC 的相对表达量 = LUC 活性值/GUS 活性值。使用 SPSS 22.0 软件进行数据处理及方差分析。

2 结果与分析

2.1 Promoter::LUC 载体的构建

以拟南芥基因组 DNA 为模板,克隆获得 5 个植物免疫相关基因的启动子序列: pFRK1、pPR2、pPDF1.2、pWRKY33 和 pWRKY29; 其条带分别为 2 781、1 513、1 541、1 665 和 2 113 bp,符合预期大小(图 2)。将上述启动子序列分别与 HBT95::LUC 载体进行重组连接,构建为目的基因启动子驱动的 LUC 瞬时表达载体 Promoter::LUC。提取目的质粒后进行 DNA 序列测定,测序结果证实上述载体构建成功。

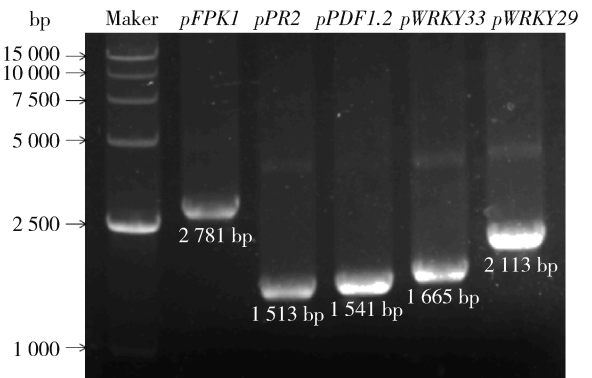


图 2 目的基因启动子序列 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of target gene promoters sequences

2.2 原生质体转化效率分析

为确定所采用的拟南芥原生质体瞬时转化系统是否可使目的载体有效表达。在进行目的载体转化的同时,以相同方法单独转入 HBT95::GFP 载体,培养 12 h 后,在荧光显微镜下检测原生质体转化效率(图 3)。结果可见,原生质体瞬时转化效率为 88%,说明该原生质体转化系统可有效进行目的基因的瞬时表达。

2.3 不同免疫相关基因启动子响应免疫信号分子的强度比较

为比较不同免疫相关基因启动子对植物免疫激发子信号的响应强度,分别将不同免疫相关基因启动子驱动的 LUC 瞬时表达载体 Promoter::LUC 与 35S::GUS 作为内参转化到拟南芥 Col-0 原生质体中瞬时共表达。分别用 H₂O(阴性对照)、FLG22 和 PEP1 处理后,根据 LUC 表达上调情况,指示免疫相关基因启动子的激活程度,从而分析比较不同免疫相关基因启动子对 FLG22 与 PEP1 的响应强度。

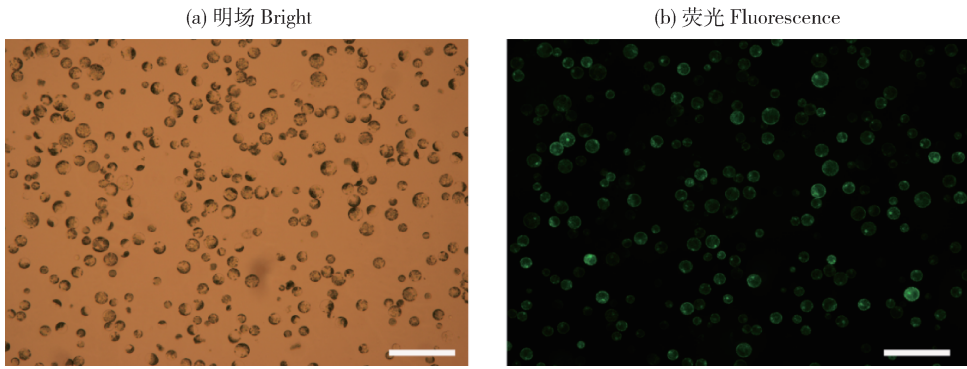
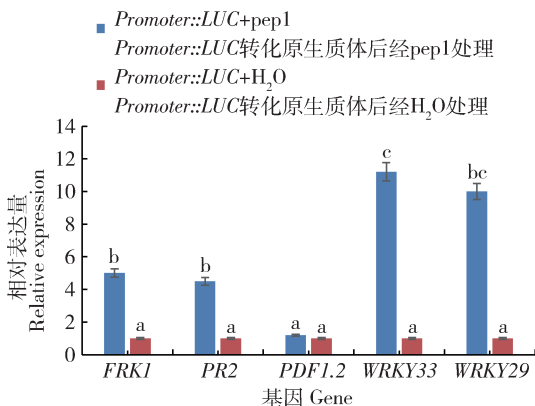


图3 拟南芥原生质体瞬时转化效率(标尺为200 μm)

Fig. 3 Transient transformation efficiency of protoplast in *Arabidopsis* (Scale bar is 200 μm)

以 H₂O 处理作为本底(即 LUC 相对表达量为 1),比较不同免疫相关基因启动子分别在 FLG22 与 PEP1 处理下的激活程度(图 4 和图 5)。结果显示:在 FLG22 处理条件下,WRKY33 响应强度最高,约为其本底的 11.0 倍,差异极显著($P < 0.01$);WRKY29 响应强度次之,约为其本底的 10.0 倍,差异极显著($P < 0.01$);FRK1 与 PR2 的响应强度在同一水平,约为其本底的 5.0 和 4.5 倍,差异显著($P < 0.05$);而 PDF1.2 几乎无响应,响应强度与其本底处于同一水平(图 4);在 PEP1 处理条件下,WRKY33 同样表现出最强的响应强度,约为其本底的 4.5 倍,差异显著($P < 0.05$);WRKY29 响应强度约为其本底的 3.1 倍;而 FRK1 与其本底相比上调 1.8 倍,PR2 上调 1.4 倍;PDF1.2 与其本底无明显差异(图 5)。



同行中不同小写字母表示差异达显著水平($P < 0.05$)。下同。

Different capital letters within the same row mean significant differences at 0.05 level. The same below.

图4 flg22 处理下不同免疫相关基因的信号响应强度

Fig. 4 Signal response intensity of different immune related genes under flg22 treatment

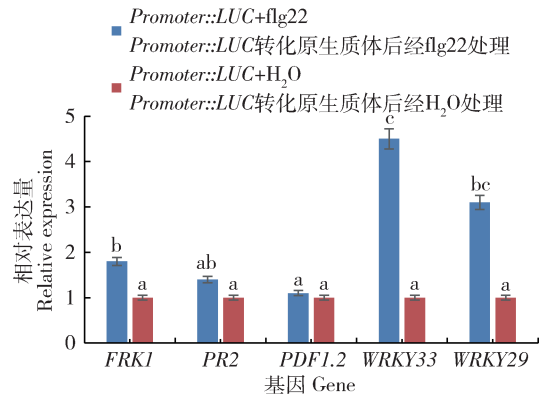


图5 pep1 处理下不同免疫相关基因的信号响应强度

Fig. 5 Signal response intensity of different immune related genes under pep1 treatment

3 讨论

植物 PTI 反应被 PAMPs 或 DAMPs 触发后,可迅速作出免疫应答,大量的免疫相关基因表达被激活,免疫信号通路启动,产生一系列生理生化反应来抵抗病原体侵袭,例如,MAPK 激活,活性氧爆发和胍脂积聚等,并可通过水杨酸(Salicylic acid, SA)和茉莉酸(Jasmonic acid, JA)信号通路使整株植物建立起对病原菌的免疫效应。FLG22 触发的 PTI 免疫反应是当前研究最为明确的植物免疫信号通路,FLS2 识别 FLG22 后触发 MEKK1-MKK4/5-MPK3/6 信号传导途径,从而放大 PTI 免疫信号^[25]。另外,PEP1 作为一种内源小分子肽,被 PEPR 识别后,激活 PEPR,触发植物免疫反应。与 flg22-FLS2 免疫通路类似,PEP1-PEPR 激活的早期免疫反应均依赖于 BAK1 和 BIK1 的磷酸化。前人研究证实,WRKY 家族转录因子通过在 MAPK

之后的信号传导中发挥重要作用来参与 PTI 反应^[23-24]。本研究结果显示, WRKY33 和 WRKY29 在 FLG22 和 PEP1 处理下均有显著的响应, 其启动子活性极显著上调, 而其中 WRKY33 在外源 PAMP 和内源 DAMP2 种激发子的刺激下都显示出最强的响应能力(图 4 和图 5)。说明 WRKY 家族, 特别是 WRKY33 是一种高效的植物 PTI 反应报告基因。

另外, 本研究结果显示不同免疫相关基因对同一免疫激发子的响应存在显著的差异。在用 FLG22 或 PEP1 处理拟南芥原生质体时, WRKY 家族转录因子的响应强度显著高于其他基因, 甚至高于常用的 PTI 反应报告基因 *FRK1*。产生这种差异的原因可能在于不同免疫相关基因在 PTI 信号通路中的响应位置及功能的不同而引起。WRKY 家族转录因子在 PTI 途径中可能位于 *FRK1* 的上游, 因此, 其对免疫信号分子的响应与 *FRK1* 相比更加迅速和高效。前人研究发现, *PDF1.2* 参与植物免疫反应受到 JA 和 ET 的调控^[19], 然而在植物免疫激发子 FLG22 与 PEP1 处理后 *PDF1.2* 均未出现明显上调, 这可能是由于 *PDF1.2* 所在 JA 免疫信号通路与 FLG22 以及 PEP1 触发的植物 PTI 免疫信号通路在信号途径的早期无直接相互作用, 因此对植物 PTI 免疫反应激活因子表现出低灵敏度低强度甚至无上调应答。此外, 将 FLG22 与 PEP1 处理后免疫相关基因的响应程度进行对比, 发现应用 PEP1 处理后免疫相关基因的响应程度总体低于应用 FLG22 处理的结果, 这可能是由于植物应对外源 PAMP 和内源 DAMP 时有着不同的信号响应通路。

运用植物自身免疫能力抵抗病原微生物的侵袭是当代绿色农业的发展方向。因此, 需要不断探索和发掘能激活植物免疫的信号物质, 用于创制安全有效的生物农药。开发灵敏高效的报告基因系统来指示免疫反应的激活程度, 对于筛选有效的植物免疫激发子具有重要的意义。在本研究中构建的 *pWRKY33::LUC* 原生质体表达体系可作为一种高效的 PTI 反应报告系统, 用于新型植物免疫激发子的筛选和鉴定。

参考文献 References

[1] Jones J D G, Dangl J L. The plant immune system[J]. *Nature*,

2006, 444(7117): 323-329

- [2] Chisholm S T, Coaker G, Day B, Staskawicz B J. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response[J]. *Cell*, 2006, 124(4): 803-814
- [3] Stael S, Kmiciec P, Willems P, van der Kelen K, Coll N S, Teige M, van Breusegem F V. Plant innate immunity-sunny side up[J]. *Trends in Plant Science*, 2015, 20(1): 3-11
- [4] Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann M R, Chiu W L, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel F M, Sheen J. MAP kinase signaling cascade in *Arabidopsis* innate immunity[J]. *Nature*, 2002, 415(6875): 977-983
- [5] Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley E J, Jones J D G, Felix G, Boller T. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception[J]. *Nature*, 2004, 428(6984): 764-767
- [6] Clay N K, Adio A M, Denoux C, Jander G, Ausubel F M. Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response[J]. *Science*, 2009, 323(5910): 95-101
- [7] Boudsocq M, Willmann M R, McCormack M, Lee H, Shan L B, He P, Bush J, Cheng S H, Sheen J. Differential innate immune signaling via Ca^{2+} sensor protein kinases[J]. *Nature*, 2010, 464(7287): 418-422
- [8] Felix G, Duran J D, Volko S, Boller T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin[J]. *The Plant Journal*, 1999, 18(3): 265-276
- [9] Gómez-Gómez L, Felix G, Boller T. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 1999, 18(3): 277-284
- [10] Gómez-Gómez L, Boller T. FLS₂: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Cell*, 2000, 5(6): 1003-1011
- [11] Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, Boller T, Felix G. The *Arabidopsis* receptor kinase FLS₂ binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception[J]. *Plant Cell*, 2006, 18(2): 465-476
- [12] Huffaker A, Pearce G, Ryan C A. An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response[J]. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 2006, 103(26): 10098-10103
- [13] Huffaker A, Dafoe N J, Schmelz E A. *ZmPep1*, an ortholog of *Arabidopsis* elicitor peptide 1, regulates maize innate immunity and enhances disease resistance[J]. *Plant Physiology*, 2011, 155(3): 1325-1338
- [14] Huffaker A, Pearce G, Veyrat N, Erb M, Turlings T C, Sartor R, Shen Z, Briggs S P, Vaughan M M, Alborn H T, Teal P E, Schmelz E A. Plant elicitor peptides are conserved signals regulating direct and indirect antiherbivore defense [J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2013, 110(14): 5707-5712
- [15] Yamaguchi Y, Pearce G, Ryan C A. The cell surface leucine-

- rich repeat receptor for *AtPep1*, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2006, 103(26):10104-10109
- [16] Yamaguchi Y, Huffaker A, Bryan A C, Tax F E, Ryan C A. PEPR₂ is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(2):508-522
- [17] Qi Z, Verma R, Gehring C, Yamaguchi Y, Zhao Y, Ryan C A, Berkowitz G A. Ca²⁺ signaling by plant *Arabidopsis thaliana* Pep peptides depends on *AtPepR1*, a receptor with guanylyl cyclase activity, and cGMP-activated Ca²⁺ channels [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(49):21193-21198
- [18] Liu Z, Wu Y, Yang F, Zhang Y, Chen S, Xie Q, Tian X, Zhou J M. BIK1 interacts with PEPRs to mediate ethylene-induced immunity [J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2013, 110(15):6205-6210.
- [19] Penninckx I A M, Thomma B P H J, Buchala A, Métraux J P, Broekaert W F. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defending gene in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1998, 10(12):2103-2113
- [20] Léon-Kloosterziel K M, Verhagen B W M, Keurentjes J J B, van Pelt J A, Rep M, van Loon L C, Pieterse C M J. Colonization of the *Arabidopsis* rhizosphere by fluorescent *Pseudomonas* spp activates a root-specific, ethylene-responsive PR-5 gene in the vascular bundle [J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 57(5):731-748
- [21] Xie Z, Zhang Z L, Zou X L, Huang J, Ruas P, Thompson D, Shen Q J. Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells [J]. *Plant Physiology*, 2005, 137(1):176-189
- [22] Asai T, Guillaume T, Plotnikova J, Willmann M R, Chiu W L, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel F M, Sheen J. MAP kinase signaling cascade in *Arabidopsis* innate immunity [J]. *Nature*, 2002, 415(6875):977-983
- [23] Qiu J L, Fiil B K, Petersen K, Nielsen H B, Botanga C J, Thorgrimsen S, Palma K, Suarez-Rodriguez M C, Sandbech-Clausen S, Lichota J, Brodersen P, Grasser K D, Mattsson O, Glazebrook J, Mundy J, Petersen M. *Arabidopsis* MAP Kinase 4 regulates gene expression via transcription factor release in the nucleus [J]. *European Molecular Biology Organization Journal*, 2008, 27(16):2214-2221
- [24] Jiang J J, Ma S H, Ye N H, Jiang M, Cao J S, Zhang J H. WRKY transcription factors in plant responses to stresses [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2017, 59(2):86-101
- [25] Suarez-Rodriguez M C, Adams-Phillips L, Liu Y L, Wang H, Su S H, Jester P J, Zhang S, Bent A F, Krysan P J. MEKK1 is required for flg22-induced MPK₄ activation in *Arabidopsis* plants [J]. *Plant Physiology*, 2006, 143(2):661-669

责任编辑:吕晓梅