

TaSPX3 基因 VIGS 沉默表达降低小麦对叶锈病 (*Puccinia recondite* f. sp. *tritici*) 的抗性

张蕊¹ 李博¹ 李旭¹ 尚文静¹ 韩迎春² 程琨¹ 刘娜^{1*} 郑文明^{1,2*}

(1. 河南农业大学 生命科学学院, 郑州 450002;

2. 河南农业大学 小麦玉米作物学国家重点实验室/河南粮食作物协同创新中心, 郑州 450002)

摘要 为挖掘 TaSPX3 基因在小麦抗叶锈病中的作用, 本研究以前期对叶锈菌感染的小麦转录组数据分析发现的 TaSPX3 基因受到叶锈菌侵染诱导表达为依据, 利用 BSMV-VIGS 系统沉默中国春和郑麦 9023 中的 TaSPX3 基因, 利用 qRT-PCR 技术进一步分析小麦抗病相关基因的转录水平。结果发现 TaSPX3 基因沉默后, 小麦叶锈菌感染加重, 降低了小麦对叶锈病的抗性; 同时, 对侵染过程抗病相关基因转录检测发现, 抗病相关基因 PR2 和 CAT 的表达水平显著下调。本研究表明 TaSPX3 基因可能通过调控 PR2 和 CAT 基因的表达参与小麦对叶锈病的抗性。

关键词 小麦; TaSPX3; VIGS; 叶锈病; 抗病性

中图分类号 S512 文章编号 1007-4333(2021)01-0026-07 文献标志码 A

Silencing the expression of TaSPX3 by VIGS decreased the resistance of wheat to leaf rust (*Puccinia recondite* f. sp. *tritici*)

ZHANG Rui¹, LI Bo¹, LI Xu¹, SHANG Wenjing¹, HAN Yingchun²,
CHENG Kun¹, LIU Na^{1*}, ZHENG Wenming^{1,2*}

(1. College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Collaborative Innovation Center of Henan Grain Crops/State Key Laboratory of Wheat and Maize Crop,
Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract In order to explore the function of TaSPX3 in wheat resistance to leaf rust based on the discover that TaSPX3 expression was induced by leaf rust infection, BSMV-VIGS system was used to silence TaSPX3 in Chinese Spring and Zhengmai 9023. qRT-PCR was adopted to analysis the expression of disease resistant genes. The results showed that: The disease severity of leaf rust on BSMV : TaSPX3 infected wheat leaves was aggravated, which indicated that the resistance to leaf rust was reduced after silencing TaSPX3 gene; The expression levels of diseases-resistance genes PR2 and CAT were significantly down-regulated in the leaves. In conclusion, TaSPX3 might be involved in wheat resistance to leaf rust fungus by regulating the expression of PR2 and CAT genes.

Keywords wheat; TaSPX3; VIGS; leaf rust; resistance

叶锈病是小麦三大锈病之一, 是由叶锈菌 (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) 引发的一种病害, 其分布范围广、发生频繁, 每年在全世界各个小麦种植区大面积流行, 对小麦产量造成严重损失^[1]。

收稿日期: 2020-05-18

基金项目: 河南省自然科学基金项目 (182300410023, 202300410202); 河南省科技攻关项目 (182102110278); 河南省教育厅重点项目 (17B210003)

第一作者: 张蕊, 硕士研究生, E-mail: zhangrui0818@163.com

通讯作者: 郑文明, 教授, 主要从事农业基因组学研究, E-mail: wmzheng@henau.edu.cn

刘娜, 副教授, 主要从事作物分子生物学及功能基因组学研究, E-mail: naliu@henau.edu.cn

为抵御病原物的攻击,植物进化出复杂的信号感知、传导和抵抗机制,例如在无毒性病原体感染过程中,植物抗性蛋白识别病原体的效应因子,并在感染部位启动超敏反应(HR)和局部程序性细胞死亡,超敏反应包括活性氧(ROS)爆发、信号分子的传递及病程相关蛋白(PR)的诱导等^[2]。过多的 ROS 积累会破坏细胞膜结构和功能,而细胞中的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)等可使 ROS 维持在正常水平^[3]。抗病品种小麦受到稻瘟病感染后,活性氧爆发程度低于感病品种,CAT 活性仅在抗病品种中升高,而其他活性氧清除酶(SOD、POD、APX)活性在不同抗性小麦中都有所升高,在抗病小麦中的增幅大于感病小麦,表明在去除稻瘟病菌感染引起的过量活性氧累积过程中,有效的活性氧清除系统能够抑制真菌对细胞的损伤,从而有助于增强小麦抗病性^[4]。

植物在受到某些病原物侵染时,会诱导病程相关蛋白(Pathogenesis-related proteins, PRs)的表达,PR 蛋白多为酸溶性、低分子量和抗蛋白酶分子,有助于植物在苛刻的条件下生存,大多数 PR 蛋白具有抗菌、杀虫和抗病毒活性,有些 PR 蛋白还具有 β -1,3-葡聚糖酶或几丁质酶活性^[5]。病程相关蛋白基因 *PR1*、*PR2*、*PR5* 是植物抗病基因介导的抗病反应中的标志基因^[6],相关小麦抗病性的研究主要有:白粉菌侵染小麦显著诱导了小麦中病程相关蛋白 *PR1*、*PR2*、*PR5* 的转录表达^[7]。条锈菌的致病因子 *Pst-milR1* 可通过抑制 *PR2* 的表达来抑制植物的免疫应答反应^[8]。王华忠等^[9]研究发现,小麦抗病反应过程中的 2 个重要的 PR 蛋白基因(几丁质酶基因和 β -1,3-葡聚糖酶基因)对白粉病菌入侵和吸器形成均有抑制作用,在一定程度增强了小麦对白粉病菌的抗性。

病毒诱导基因沉默(Virus induced gene silencing, VIGS)技术在植物抗病研究中被广泛应用,该技术是基于转录后基因沉默(Post-transcriptional gene silencing, PTGS),可引起内源 mRNA 特异性降解,其原理是在病毒载体中插入特异性目的片段,侵染宿主植物后,植物表现出目的基因表达水平下降或基因功能丧失^[10]。利用 VIGS 技术可在相对快速的时间内沉默目的基因,该技术已被用于单子叶植物和双子叶植物中^[11]。大麦条纹花叶病毒诱导的基因沉默(BSMV-VIGS)系统最初是在大麦上被开发出来,现在广泛应用于研究小麦的基因功

能^[12]。王新博等^[13]利用 BSMV-VIGS 系统沉默小麦 *TaEF-1 α* 基因,与正常植株相比,VIGS 沉默处理后的植株对干旱胁迫更加敏感,因此 *TaEF-1 α* 基因可能在小麦干旱胁迫响应中发挥关键作用,Feng 等^[14]利用 VIGS 技术沉默 *TaMDHAR4* 基因后发现,小麦受到条锈菌感染部位坏死面积比例增加,对条锈菌的抗性受到了抑制。

本实验室前期在对接种叶锈菌后的小麦转录组数据分析中发现,*TaSPX3* 基因的转录水平受到叶锈菌侵染诱导,推测 *TaSPX3* 基因可能参与小麦抗叶锈病过程。*TaSPX3* 基因属于 *SPX* 基因家族,该基因家族共有结构域最早是从酵母 *gpa1* 抑制子(SYG1)、酵母周期依赖性蛋白(PHO81)和人的异嗜性多变逆转录病毒受体(Xpr1)中发现的,因此以这三者首字母命名。*SPX* 蛋白结构域较为保守,平均长度为 165 个氨基酸,组成 3 个亚结构域,每个亚结构域由 30~40 个氨基酸组成,3 个亚结构域的序列相似性较低。*SPX* 基因家族通常在维持细胞内磷稳态中发挥着重要作用,参与植物低磷胁迫应答^[15]。研究发现小麦 *SPX* 基因可能参与小麦高温抗条锈病^[16]。目前关于 *TaSPX3* 参与小麦抗叶锈病过程的作用机制研究尚未见报道,因此,为深入了解 *TaSPX3* 基因在小麦抗叶锈病中的作用,本试验拟采用 BSMV-VIGS 系统沉默中国春和郑麦 9023 中 *TaSPX3* 基因,在沉默植株上接种叶锈菌,并利用 qRT-PCR 技术对 *TaSPX3* 的表达水平进行检测,观察小麦对叶锈菌侵染的反应,检测小麦抗病相关基因 *PR2*、*CAT* 的表达水平,以期为进一步明确 *TaSPX3* 的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试小麦品种为中国春和郑麦 9023;供试烟草品种为本生烟;供试菌株为小麦叶锈菌(*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*)HnZU18-3 单孢系,该菌系由本实验室鉴定并保存。

1.2 构建大麦条纹花叶病毒介导的 *TaSPX3* 基因沉默体系

本试验中所用载体有 α 、 β 、 γ 和 γ -PDS,载体由河南农业大学农学院王道文教授课题组提供。*TaSPX3* 基因 cDNA 全长 789 bp,由本实验室前期从郑麦 9023 中克隆得到。从 *TaSPX3* 基因 cDNA 上选取 122 bp 的特异性序列作为 VIGS 的靶标序

列,设计特异性引物(表1),从实验室已有的 *TaSPX3*-T 重组质粒中克隆出带有 LIC 接头的目的片段,利用 T4 DNA 连接酶将目的片段与线性化 γ 载体(限制性内切酶 *Apa* I 处理)连接,连接产物转化大肠杆菌,设计引物 VIGS-Test-F/R(表1)进行菌落 PCR 筛选阳性克隆,送至公司测序验证阳性克隆,重组质粒命名为 γ -*TaSPX3*。

分别将 γ (Empty vector)、 γ -PDS、 γ -*TaSPX3* 3 种质粒与 α 、 β 按照 1 : 1 : 1 的比例混匀,组装成 BSMV : EV、BSMV : PDS、BSMV : *TaSPX3* 3 种 VIGS 病毒,利用烟草转染方法,沉默中国春和郑麦 9023 中的基因^[17],由于本实验室前期研究发现中国春和郑麦 9023 对叶锈病的抗性不同,郑麦 9023 对叶锈病的抗性比中国春强,因此选择这两个品种小麦来进行研究。接种 BSMV : PDS 的小麦用于验证本试验所用的 BSMV-VIGS 沉默体系是否有效,*PDS* 基因是小麦八氢番茄红素脱氢酶基因,若该基因被沉默,小麦叶片则会出现白化。接种 BSMV : *TaSPX3* 的小麦为试验组,用于研究 *TaSPX3* 基因被沉默后小麦对叶锈菌的抗性。接种 BSMV : EV 的小麦中没有沉默任何基因,作为以上两种小麦的

对照。VIGS 病毒接种于小麦第二片叶,接种 14 d 后,观察接种 BSMV : PDS 的小麦叶片出现白化现象,再将实验室保存的叶锈菌孢子均匀洒在接种 BSMV : EV 和 BSMV : *TaSPX3* 的小麦叶片上,在接种锈菌后的第 7 天,观察小麦叶片感病表型,分析 *TaSPX3* 基因沉默对小麦抗病性的影响。

1.3 qRT-PCR

沉默植株和对照组接种叶锈菌后 0、12、24 h 分别取样,利用 Trizol Reagent(康为世纪生物科技有限公司, CW0580S, 北京)提取样品 RNA,利用 HiScript II QRTsuperMix for qPCR(南京诺唯赞医疗科技有限公司, 223-01, 南京)试剂盒,按提供的操作流程,将 RNA 反转录成 cDNA。以小麦 26S 为内参基因,检测 *TaSPX3* 基因和小麦抗病相关基因 *PR2*、*CAT* 的相对表达量,检测 *TaSPX3* 基因的沉默效果,分析 *TaSPX3* 基因沉默对抗病相关基因转录水平的影响。用于荧光定量的引物见表 1。

目的基因的相对表达水平按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算,每组试验进行 3 次独立的生物学试验,利用 *T*-test 方法对结果进行显著性分析。

表 1 本试验所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
VIGS-122-F	AAGGAAGTTTAAGACAAGTTCCTGGCGTACAAGCG
VIGS-122-R	AACCACCACCACCGTAACCTGTCCACCTCGTCATTGAG
VIGS-test-F	CACAGTTGTGGAATGCCATGCTC
VIGS-test-R	CGAGCTCCTGCAGGACAGTC
Ta26S-F	GAAGAAGGTCCCAAGGGTTC
Ta26S-R	TCTCCCTTTAACACCAACGG
TaSPX3yg-F	GCTCGTCCGACTCGTCTCCG
TaSPX3yg-R	CGCCTTCACCGTCTCCCTTAC
CAT-F	CAACTCCGGCTACTGGACCAC
CAT-R	ACAACACGTTACAGGGATACGC
PR2-F	TGCTTCCATGTTTGCCGTTGCT
PR2-R	TGTAGAGCTGCACCACGTCGCT

2 结果与分析

2.1 VIGS 重组质粒的构建

以 *TaSPX3*-T 重组质粒为模板,利用引物

VIGS-122-F/R 进行 PCR 反应,克隆得到 122 bp 的特异性靶标序列,用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,对 PCR 产物进行回收,将回收产物与线性化的 γ 载体连接,连接产物转化大肠杆菌,挑选单

克隆菌落,利用引物 VIGS-test-F/R 筛选阳性克隆,将阳性克隆送至公司测序后,与靶标序列比对完全一致,表明重组质粒构建成功。

2.2 BSMV-VIGS 沉默体系有效性验证

为验证本试验所用的 BSMV-VIGS 体系是否有效,对 2 种小麦接种 BSMV : PDS 病毒,以沉默小麦叶片中的 *PDS* 基因,并与接种 BSMV : EV 病毒后的小麦叶片作对照,结果见图 1。如图 1 所示,中国春和郑麦 9023 中接种 BSMV : PDS 的小麦叶片均出现白化现象,表明本试验所用的 BSMV-VIGS 沉默体系能够有效沉默小麦基因。

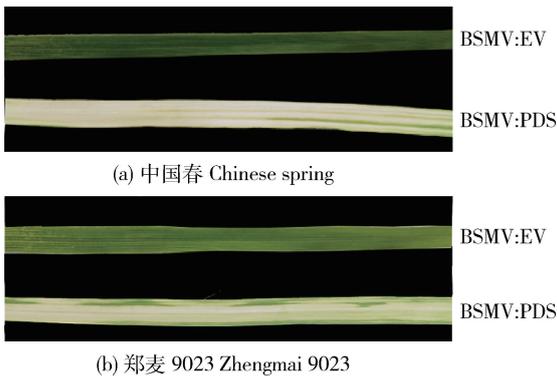


图 1 分别接种 BSMV : EV 和 BSMV : PDS 的小麦叶片表型

Fig. 1 Phenotypes of wheat leaves respectively inoculated with BSMV : EV and BSMV : PDS

2.3 *TaSPX3* 基因沉默效果检测

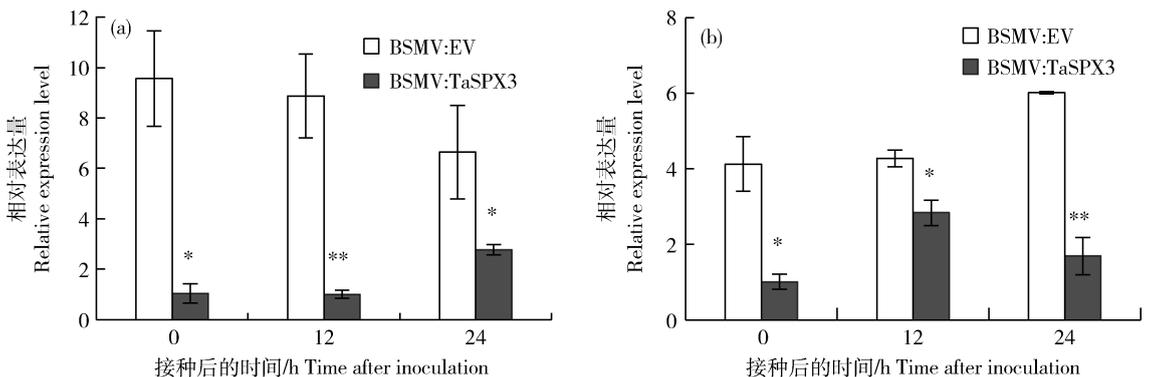
为进一步验证 *TaSPX3* 基因是否被有效沉默,利用 qRT-PCR 技术检测感染 VIGS 病毒的中国春和郑麦 9023 接种叶锈菌后的 0、12、24 h 叶片

中 *TaSPX3* 基因的表达水平,结果如图 2 所示;在 2 种遗传背景下,与感染 BSMV : EV 的小麦相比,感染 BSMV : *TaSPX3* 病毒的小麦在接种叶锈菌后的 0、12、24 h, *TaSPX3* 基因的表达水平均显著降低,表明接种 BSMV : *TaSPX3* 病毒有效沉默了中国春和郑麦 9023 中的 *TaSPX3* 基因。

2.4 基因沉默后小麦抗病性研究

为进一步研究 *TaSPX3* 基因在小麦抗叶锈病中的作用,给野生型和感染 VIGS 病毒小麦接种叶锈菌,7 d 后观察叶片感病表型(图 3)。如图 3 所示,2 种遗传背景下,感染 BSMV : *TaSPX3* 病毒的小麦叶片明显比野生型小麦和感染 BSMV : EV 的小麦叶片上产生更多的叶锈菌孢子,表明 *TaSPX3* 基因沉默的小麦对叶锈病的抗性降低。

接种锈菌后 0、12、24 h 检测了 6 个小麦抗病相关基因的表达量,其中 *PR2* 和 *CAT* 的表达量差异显著。如图 4(a)所示,感染 BSMV : EV 中国春的 *PR2* 基因在接种锈菌 12 h 时显著上调,而感染 BSMV : *TaSPX3* 中国春的 *PR2* 基因在 24 h 时才显著上调,中国春中 *TaSPX3* 基因被沉默后接种叶锈菌,*PR2* 基因的表达受到了抑制;如图 4(b)所示,感染 BSMV : *TaSPX3* 郑麦 9023 接种叶锈菌后 *PR2* 基因的表达显著低于感染 BSMV : EV 的郑麦 9023,表明 *TaSPX3* 基因的沉默显著抑制了郑麦 9023 中 *PR2* 的表达;如图 4(c)、(d)所示,在 2 种遗传背景下,*CAT* 基因在感染 BSMV : *TaSPX3* 小麦中的表达量显著低于感染 BSMV : EV 的小麦,表明中国春和郑麦 9023 中 *TaSPX3* 基因的沉默使叶锈菌侵染后 *CAT* 基因的表达显著下调。



* 为显著差异 $P < 0.05$, ** 为极显著差异 $P < 0.01$ 。

* Significant difference $P < 0.05$, ** Extremely significant difference $P < 0.01$.

图 2 感染 VIGS 病毒的中国春(a)和郑麦 9023(b)接种叶锈菌后 *TaSPX3* 基因相对表达水平

Fig. 2 Relative expression level of *TaSPX3* after inoculation of leaf rust in Chinese Spring (a) and Zhengmai 9023 (b) infected with VIGS virus

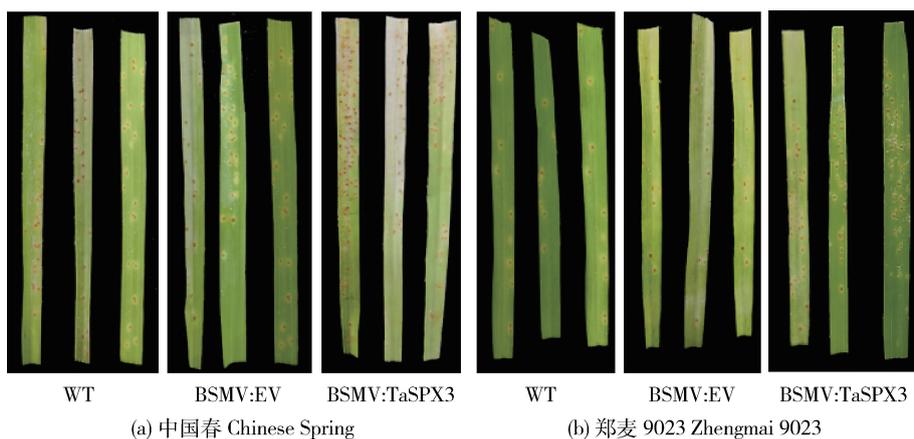
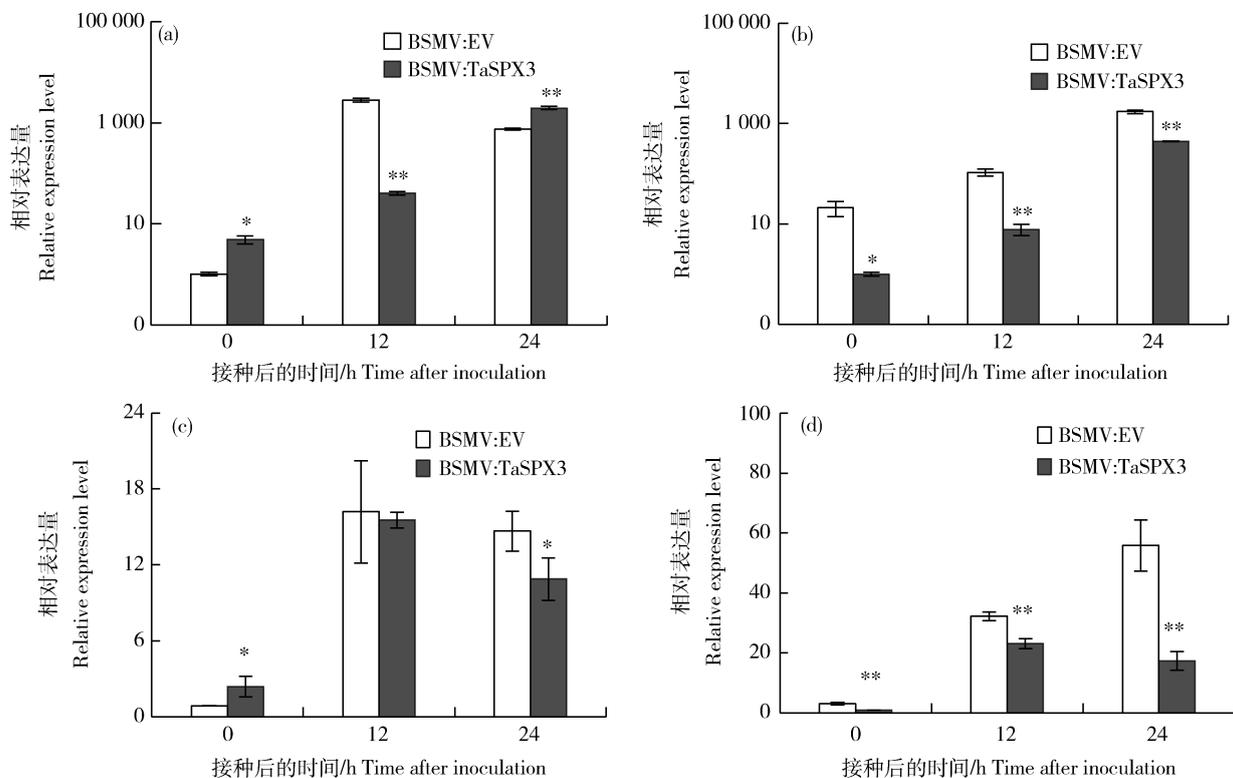


图3 野生型小麦和感染 VIGS 病毒的小麦接种叶锈菌后叶片表型

Fig. 3 Leaf phenotypes of wild-type wheat and wheat infected with VIGS virus inoculated with leaf rust



(a) 中国春 *PR2* 基因; (b) 郑麦 9023 *PR2* 基因; (c) 中国春 *CAT* 基因; (d) 郑麦 9023 *CAT* 基因。

(a) *PR2* in Chinese Spring; (b) *PR2* in Zhengmai 9023; (c) *CAT* in Chinese Spring; (d) *CAT* in Zhengmai 9023;

* 为显著差异 $P < 0.05$, ** 为极显著差异 $P < 0.01$ 。

* Significant difference $P < 0.05$, ** Extremely significant difference $P < 0.01$.

图4 感染 VIGS 病毒的小麦接种叶锈菌后 *PR2* 和 *CAT* 基因相对表达水平

Fig. 4 Relative expression levels of *PR2* and *CAT* in wheat infected with VIGS virus inoculated with leaf rust

以上研究结果表明, *TaSPX3* 基因沉默抑制了抗病相关基因 *PR2*、*CAT* 的表达, 从而降低了小麦对叶锈菌的抗性, 因此 *TaSPX3* 基因正调控小麦对叶锈病的抗性。

3 讨论与结论

病程相关蛋白广泛存在于不同植物中, 是植物防御反应中的重要成员。其中 *PR2* 是 β -1, 3-

葡聚糖酶,能够催化 β -1,3-葡聚糖多聚体水解,可直接攻击入侵菌丝壁,并且它催化的水解产物可以作为信号分子,进一步诱导防御,从而增强植物抗病性^[18]。信号分子水杨酸(SA)、脱落酸(ABA)均能诱导 *PR2* 基因的表达,有研究显示 *PR2* 可能通过 SA 和 ABA 介导的信号通路参与小麦抗叶锈病反应^[19]。本研究中 *TaSPX3* 基因的沉默抑制了 *PR2* 的转录表达,表明 *TaSPX3* 基因可能通过调控 *PR2* 的表达影响入侵菌丝在寄主细胞内的生长,诱导植物防御反应,从而调控植物的抗病性。

植物细胞氧化还原过程是由复杂的遗传网络调控,过氧化氢酶(CAT)是最重要的活性氧清除酶之一,CAT 在清除各种代谢途径产生的 H_2O_2 积累方面发挥重要作用^[20]。高芬等^[21]将拮抗菌制成液体培养基,黄瓜、西瓜、青椒 3 种植物经拮抗菌液体培养基处理后,其中 CAT 和 β -1,3-葡聚糖酶活性明显提高,增强了植物抗病性。本研究利用 BSMV-VIGS 体系在中国春和郑麦 9023 这 2 种遗传背景下沉默小麦基因,构建了 BSMV : EV、BSMV : PDS、BSMV : *TaSPX3* 3 种 VIGS 病毒,接种 BSMV : PDS 的小麦叶片出现白化现象,表明该体系能够有效沉默小麦基因;通过 qRT-PCR 方法检测 *TaSPX3* 基因的相对表达量,发现感染 BSMV : *TaSPX3* 的小麦中 *TaSPX3* 基因表达水平显著低于对照组,表明 BSMV-VIGS 体系有效沉默了 *TaSPX3* 的表达。对感染 BSMV : *TaSPX3* 的小麦接种叶锈菌,观察到 BSMV : *TaSPX3* 小麦叶片上锈菌孢子堆相比于对照组显著增多,检测了多个抗病相关基因表达水平后发现 *PR2* 和 *CAT* 的表达水平在基因沉默植株中明显受到了抑制,表明沉默 *TaSPX3* 基因可抑制 *PR2* 和 *CAT* 的表达,可能是降低小麦对叶锈菌的抗性的途径。如图 3 所示,郑麦 9023 对叶锈菌的抗性比中国春强,但在 2 种遗传背景下,*TaSPX3* 基因沉默后,都降低了对叶锈菌的抗性,*PR2* 和 *CAT* 的表达均受到了抑制,表明 *TaSPX3* 基因增强小麦对叶锈病的抗性并无品种间的差别,可能具有广谱抗性。

本研究表明,*TaSPX3* 基因可能正调控 *PR2*、*CAT* 并参与小麦对叶锈病的抗性机制。研究结果为下一步深入阐明 *TaSPX3* 基因在调控小麦抗病机制中的作用提供了基础。

参考文献 References

- [1] 吕欣迪,唐华山,耿妙苗,米阳阳,李映辉,李峰,刘培园,解超杰,孙其信. 小麦品种辽春 10 抗叶锈病基因 *LrLCL10* 的比较基因组学定位[J]. 中国农业大学学报, 2017, 22(4): 1-9
Lv X D, Tang H S, Geng M M, Mi Y Y, Li Y H, Li F, Liu P Y, Xie C J, Sun Q X. Comparative genomics analysis of leaf rust resistance gene *LrLCL10* in common wheat cultivar Liaochun 10[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2017, 22(4): 1-9 (in Chinese)
- [2] Hong J K, Hwang I S, Hwang B K. Functional roles of the pepper leucine-rich repeat protein and its interactions with pathogenesis-related and hypersensitive-induced proteins in plant cell death and immunity[J]. *Planta*, 2017, 246(3): 351-364
- [3] 龙书生,曹远林,李亚玲,康振生. 小麦抗条锈病过敏性坏死反应中的活性氧代谢[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2009, 37(11): 125-130
Long S S, Cao Y L, Li Y L, Kang Z S. Metabolism of reactive oxygen species in the process of hypersensitive response of wheat to stripe rust [J]. *Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition*, 2009, 37(11): 125-130 (in Chinese)
- [4] Debona D, Rodrigues F Á, Rios J A, Nascimento K J T. Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae* [J]. *Phytopathology*, 2012, 102(12): 1121-1129
- [5] Jo B R, Yu J M, Jang S, Ahn J W, Kim H S, Seoung E A, Park H Y, Jin D H, Joo S S. Cloning, expression, and purification of a pathogenesis-related protein from *Oenanthe javanica* and its biological properties [J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2020, 43(1): 158-168
- [6] 张玉,杨爱国,冯全福,蒋彩虹,耿锐梅,罗成刚. 植物病程相关蛋白及其在烟草中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2012, 5: 20-24
Zhang Y, Yang A G, Feng Q F, Jiang C H, Geng R M, Luo C G. Plant Pathogenesis-related proteins and research progress in tobacco [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2012, 5: 20-24 (in Chinese)
- [7] 牛吉山,刘瑞,郑磊. 小麦 *PR-1*、*PR-2*、*PR-5* 基因的白粉菌和水杨酸诱导表达分析及白粉病抗性研究(英文)[J]. 麦类作物学报, 2007, 27(6): 1132-1137
Niu J S, Liu R, Zheng L. Expression analysis of wheat *PR-1*、*PR-2*、*PR-5* activated by *Bgt* and SA, and powdery mildew resistance [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2007, 27(6): 1132-1137 (in Chinese)
- [8] Bing W, Yanfei S, Na S, Mengxin Z, Rui L, Hao F, Xiaojie W, Zhensheng K. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* microRNA-like RNA 1 (*Pst-milR1*), an important pathogenicity factor of *Pst*, impairs wheat resistance to *Pst* by

- suppressing the wheat pathogenesis-related 2 gene[J]. *The New phytologist*, 2017, 215(1): 338-350
- [9] 王华忠, 邢莉萍, 李万隆, 陈佩度. 利用瞬时表达技术分析小麦几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖苷酶基因的抗病性功能[J]. 麦类作物学报, 2006, 26(1): 7-12
- Wang H Z, Xing L P, Li W L, Chen P D. Disease-resistance function analysis of wheat chitinase and β -1,3-Glucanase genes by a transient expression system[J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2006, 26(1): 7-12 (in Chinese)
- [10] 吕亮杰, 宿振起, 孙丽静, 王莉梅, 李辉. 利用 VIGS 技术初步验证 WSR1 基因功能的研究[J]. 麦类作物学报, 2019, 39(3): 268-276
- Lv L J, Su Z Q, Sun L J, Wang L M, Li H. Preliminary validation of WSR1 gene function by VIGS technology[J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2019, 39(3): 268-276 (in Chinese)
- [11] Gunupuru L R, Perochon A, Ali S S, Scofield S R, Doohan F M. Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) for functional characterization of disease resistance genes in barley seedlings[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 1900: 95-114
- [12] Tavakol E. Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) in *Aegilops tauschii* and its use in functional analysis of *AetDREB2*[J]. *Molecular Biotechnology*, 2018, 60(1): 41-48
- [13] 王新博, 任永哲, 岳慧芳, 李乐, 吕伟增, 史校艳, 辛泽毓, 王志强, 林同保. 基于 VIGS 技术的小麦干旱响应基因 *TaEF-1a* 的功能研究[J]. 华北农学报, 2018, 33(2): 72-78
- Wang X B, Ren Y Z, Yue H F, Li L, Lv W Z, Shi J Y, Xin Z Y, Wang Z Q, Lin T B. VIGS-based functional analysis of wheat drought responsive gene *TaEF-1a*[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2018, 33(2): 72-78 (in Chinese)
- [14] Feng H, Liu W, Zhang Q, Wang X, Wang X, Duan X, Li F, Huang L, Kang Z. *TaMDHAR4*, a monodehydroascorbate reductase gene participates in the interactions between wheat and *Puccinia striiformis* f sp *tritici*[J]. *Plant physiology and biochemistry: PPB*, 2013, 76(2014): 7-16
- [15] Liu N, Shang W, Li C, Jia L, Zheng W M. Evolution of the SPX gene family in plants and its role in the response mechanism to phosphorus stress[J]. *Open Biology*, 2018, 8(1): 170231
- [16] 魏学宁, 小麦 *TaSPX-MFS* 基因的克隆及其在小偃 54 高温诱导抗条锈性中的功能分析[D]. 北京: 中国科学院, 2012
- Wei X N, Cloning of wheat *TaSPX-MFS* gene and its functional analysis in resistance to strip rust induced by high temperature of Xiaoyan 54[D]. Beijing: Chinese Academy of Sciences, 2012 (in Chinese)
- [17] Yuan C, Li C, Yan L, Jackson A O, Liu Z, Han C, Yu J, Li D. A high throughput barley stripe mosaic virus vector for virus induced gene silencing in monocots and dicots[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26468
- [18] 高琳, 栗小英, 张艳俊, 王海燕, 刘大群. 叶锈菌与小麦互作过程中 β -1,3-葡聚糖酶基因的表达分析[J]. 河北农业大学学报, 2014, 37(3): 7-12
- Gao L, Li X Y, Zhang Y J, Wang H Y, Liu D Q. Expression Analysis of β -1, 3-glucanases gene from wheat defense responses to *Puccinia triticina* [J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2014, 37(3): 7-12 (in Chinese)
- [19] 栗小英, 高琳, 张艳俊, 王海燕, 刘大群. 叶锈菌及信号分子诱导小麦 TcLr35 中 β -1,3-葡聚糖酶基因的表达分析[J]. 中国农业科学, 2014, 47(14): 2774-2783
- Li X Y, Gao L, Zhang J Y, Wang H Y, Liu D Q. Expression and analysis of β -1,3-Glucanase gene in wheat TcLr35 induced by wheat leaf rust pathogen and signal molecule[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(14): 2774-2783 (in Chinese)
- [20] Mhamdi A, Noctor G, Baker A. Plant catalases; Peroxisomal redox guardians[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2012, 525(2): 181-194
- [21] 高芬, 郝变青, 马利平, 乔雄梧. 防治蔬菜枯萎病的芽孢杆菌对植物体内酶活性的影响[J]. 中国生态农业学报, 2003, 11(1): 38-40
- Gao F, Hao B Q, Ma L P, Qiao X W. The influence of vegetable wilt (*Fusarium oxysporum* f sp) preventing-antagonistic microorganisms (*Bacillus* sp) on the activity of some enzymes in plants [J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2003, 11(1): 38-40 (in Chinese)

责任编辑: 杨爱东