

## 玉米抗病相关基因 *NPR1* 的同源克隆及表达分析

武健东, 洪玲, 江海洋, 朱苏文\*

(安徽农业大学生命科学学院, 安徽省作物生物学重点实验室, 合肥 230036)

**摘要:** *NPR1* 是植物系统获得性 (systemic acquired resistance, SAR) 抗病反应中的关键基因, 对植物的广谱抗性起重要调控作用。以玉米自交系“齐 319”为材料, 通过 PCR 方法克隆到一个玉米 *NPR1* 基因 (命名为 *ZmNPR1*)。序列分析结果显示 *ZmNPR1* 包含两个保守结构域 POZ/BTB 位点和 Ankyrin repeat 锚蛋白重复位点。蛋白质聚类分析表明 *ZmNPR1* 与水稻 *OsNPR2* 的同源性最高。亚细胞定位结果显示 *ZmNPR1* 定位于洋葱表皮细胞的细胞核中。半定量 PCR 结果显示, *ZmNPR1* 和玉米防卫基因 *PAL* (编码苯丙氨酸解氨酶) 响应水杨酸、玉米矮花叶病毒和玉米小斑病原菌的诱导并显著上调表达; 而 *ZmNPR1* 和 *PAL* 的表达水平受到茉莉酸甲酯的明显抑制。这表明 *ZmNPR1* 在玉米中参与到水杨酸介导的抗病反应通路。

**关键词:** 玉米; *NPR1*; 水杨酸; 抗病性

中图分类号: S513

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)05-0651-06

## Cloning and expression analysis of the disease-related gene *NPR1* in maize

WU Jiandong, Hong Ling, JIANG Haiyang, ZHU Suwen

(Kay Laboratory of Crop Biology of Anhui Province, School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** The *NPR1* gene plays a key role in systemic acquired resistance (SAR) and provides broad-spectrum resistance in plants. In this study, the *NPR1* gene was cloned from the maize inbred line “Qi 319” based on PCR technique and was named as *ZmNPR1*. Sequence analysis exhibited two conserved POZ/BTB domains and an ankyrin repeat domain in the *ZmNPR1* protein. Phylogenetic analysis showed that *ZmNPR1* was high homology with rice *OsNPR2*. Transient expression of the *ZmNPR1*-GFP fusion protein in onion skin cells showed a nuclear localization of *ZmNPR1*. RT-qPCR showed that expression of *ZmNPR1* and the gene *PAL*, which encodes a pathogenesis-related protein, were induced by the treatment of salicylic acid (SA), Maize mosaic virus and Maize *Helminthosporium maydis*, whereas the expression level of *ZmNPR1* was inhibited by methyl jasmonate. Taken together, these results suggest that the *ZmNPR1* gene plays an important role in the SA-mediated disease resistance pathway in maize.

**Key words:** maize; *NPR1*; SA; disease resistance

植物在长期进化过程中, 为抵御病原物的侵袭逐步形成了一系列的防御体系。系统获得抗性 systemic acquired resistance, SAR) 是其中一种可诱导的植物抗性反应, 具有系统性、持久性、广谱性等作用特点<sup>[1]</sup>。水杨酸 (Salicylic acid, SA) 是植物体内合成的包含一个羟基的酚类化合物, 研究表明, SA 能够诱导植物对多种真菌、细菌和病毒产生抗性, 在植物抗病反应中起着非常重要的诱导作用<sup>[2]</sup>。此

外, SAR 反应的诱发除了 SA 的积累, 还伴有病程相关蛋白 (pathogenesis related proteins, PR 蛋白) 的协同表达<sup>[3-6]</sup>。

病程相关基因非表达子 (nonexpressor of pathogenesis-related genes 1, NPR1) 是 SA 诱导 SAR 反应中的关键调节基因, 位于 SA 积累的下流, PR 蛋白基因表达的上游<sup>[7-8]</sup>。1994 年, Cao 等人<sup>[9]</sup>从拟南芥中首次分离出了 *npr1* 突变体, 该突变株导致相关

收稿日期: 2015-06-10

基金项目: 安徽省自然科学基金 (1408085MKL35) 和安徽省博士后研究人员科研项目共同资助。

作者简介: 武健东, 博士, 讲师。E-mail: wujiandong@ahau.edu.cn

\* 通信作者: 朱苏文, 教授, 博士生导师。E-mail: zhusuwen2014@126.com

PR 蛋白基因无法表达 SAR, 不能产生抗病性。随后, Dong 等人<sup>[10]</sup>通过图位克隆的方法(Map-based strategy)获得了 *NPR1* 基因, 并把 *NPR1* 导入拟南芥 *npr1* 突变体中, 拟南芥 *npr1* 突变体对 SA 诱导的活性得到恢复, SAR 被重新建立。生物信息学分析结果显示 *NPR1* 含有一个位于 N 端 BTB/POZ (broad-complex, tramtrack, and ric-a-brac/pox virus and zinc finger) 结构域和一个位于中间区域锚蛋白重复结构域 ANK (ankylin repeat domain), 这 2 个结构域在蛋白质间相互作用中起到重要作用, 其中锚蛋白重复序列对 *NPR1* 的功能极为重要<sup>[11-12]</sup>。在植物细胞质内, *NPR1* 蛋白之间形成二硫键, 从而以多聚体的形式存在。当感染病原菌后, 多聚体会分离并释放 *NPR1*。*NPR1* 单体进入细胞核与 TGA 家族转录因子结合, 激活相关蛋白的表达, 进而引起 SAR 反应<sup>[13]</sup>。目前, 已从拟南芥、水稻、烟草、小麦、棉花和苹果等多种植物中分离到 *NPR1* 基因, 并对其抗病功能进行了不同程度的分析<sup>[12, 14-18]</sup>。例如, 2001 年 Chern 等人将拟南芥 *NPR1* 基因导入水稻中, 发现转基因水稻植株对 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 的抗性明显提高, 从而首次证明了 *NPR1* 在单子叶植物中同样具有提高植物抗病性的功能<sup>[19]</sup>。

研究表明, 茉莉酸甲酯(Methyl jasmonic acid, MeJA)和乙烯(ET)也能诱导 *NPR1* 的表达从而诱发诱导系统抗性(induced systemic resistance, ISR), 这种依赖于 MeJA 和 ET 信号分子介导的抗病路径与 SA 介导的抗病路径有所不同。SA 的积累可以抑制 JA 调控基因的表达和 JA 的生物合成; 有趣的是, SA 和 JA 在信号传导通路中的拮抗作用也需要 *NPR1* 的参与<sup>[20]</sup>。

玉米的种植面积和产量已超过水稻, 成为世界第一粮食作物, 同时也成为了研究进化生物学、分子生物学和遗传学的模式植物。玉米基因组测序的完成和注释为研究者对基因的分离和功能分析提供了便利<sup>[21]</sup>。虽然在拟南芥、水稻、烟草等植物中发现了多个 *NPR1* 的同源序列, 并对其功能进行了研究。然而, 对于玉米中 *NPR1* 基因的功能研究还未见报道, 玉米 *NPR1* 基因是否也具有调控植物抗病性的功能还不清楚。因此, 克隆并对玉米中 *NPR1* 基因的功能进行初步研究, 为玉米抗病机理的揭示和新品种的改良奠定理论基础。本研究从玉米中克隆了一个 *NPR1* 基因, 并对其分子特征进行了分析, 同时还对水杨酸、茉莉酸、玉米矮花叶病毒及玉米小斑病原菌诱导下 *NPR1* 基因和防卫基因 *PAL* 的表达水平进行了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

玉米 (*Zea mays* L.) 齐 319 自交系由安徽农业大学作物生物学省重点实验室繁殖保存。玉米种植条件温度为 28℃, 光周期为 14 h 光照/10 h 黑暗。

### 1.2 方法

**1.2.1 RNA 的提取及反转录** 称取 0.1 g 四叶期玉米齐 319 自交系的叶片, 液氮中研磨成粉末状; 加 2 mL RNAiso Plus 研棒至裂解液透明状为止; 将匀浆转移至 1.5 mL eppendorf 管中, 室温静置 5 min; 4℃, 12000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 吸取上清加 200 μL 氯仿: 异戊醇(24:1), 剧烈震荡 15 s, 室温静置 5 min; 4℃下, 12000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 吸取上层水相于 EP 管中, 加 600 μL 异丙醇, 上下颠倒混匀静置 10 min; 4℃下, 12000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min; 去上清, 加 1 mL 75%乙醇润洗, 4℃ 12000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 去上清, 室温干燥 2~5 min, 使乙醇尽量去干净, 加 20 μL RNA free 水溶解。使用 Promega 公司的 Reverse Transcription System 反转录试剂盒对提取的 RNA 进行反转录, 得到 cDNA。

**1.2.2 *NPR1* 基因的克隆** 从 [http://www.maizegenome.org/data\\_portal.html](http://www.maizegenome.org/data_portal.html) 中下载玉米全基因组数据, 以拟南芥与水稻种 *NPR* 基因的保守序列为模板, 通过 DNAtools version 6.0 软件进行序列比对, 按同源性的高低进行排序, 去除重复序列; 结合在线软件 <http://pfam.xfam.org/> 逐个分析, 选择含有 *NPR* 保守结构域(即 POZ/BTB 和 Ankylin repeat) 的序列, 最后共筛选到了 8 个序列。根据这 8 个序列设计引物, 如表 1 所示, 利用 PCR 技术扩增相应序列, PCR 扩增所用程序: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 59℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 循环 35 次, 72℃ 继续延伸 10 min 后。将所扩增片段连接中间载体, 进行测序。

**1.2.3 亚细胞定位分析** 为了分析 *NPR1* 在细胞内的定位, 以表 1 中 *ZmNPR1-F/ZmNPR1-R* 为引物, PCR 扩增 *ZmNPR1*, 扩增片段和表达载体 *pCambia1302-GFP* 经 *Kpn* I 与 *Xba* I 酶切后, 连接转化后挑选阳性克隆送去测序。通过洋葱表皮细胞分析 *NPR1* 的定位情况, 具体步骤如下: 将新鲜洋葱内表皮用镊子剥下, 平铺于含 0.4 mol·L<sup>-1</sup> 甘露醇的高渗 MS 培养基中 28℃ 预培养 4 h, 备用; 微弹的制备: 称 3 mg 金粉, 用 50 μL 无水乙醇和 50 μL 无菌水分别清洗, 最后加入 50 μL 无菌水溶解, 备用; DNA 的包裹: 在 1.5 mL EP 管中, 在涡旋仪上

依次加入 50  $\mu\text{L}$  金粉、5  $\mu\text{L}$  质粒 ( $1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )、50  $\mu\text{L}$   $2.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  和 20  $\mu\text{L}$   $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  亚精胺, 静置 10 min。震荡混匀, 冰上放置 10 min, 离心弃上清, 用 80  $\mu\text{L}$  无水乙醇清洗, 再次离心弃上清后 30  $\mu\text{L}$  无水乙醇定容; 参照 PDS-1000He 型基因枪的使用说明书, 无菌条件下将包裹有目的 DNA 的微弹轰击到洋葱表皮细胞中, 其中可裂膜压力参数为 1100 Psi; 轰击后的培养基  $28^\circ\text{C}$  培养 2 h 后, 将洋葱表皮细胞转移到含 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Kan 抗性的 MS 等渗培养基中继续培养。48 h 后, 荧光显微镜下进行观察。

表 1 引物名称和序列

Table 1 Primer names and sequences in this study

引物 Primer name	序列 Sequences
1-F	GGCCTTGATCACCTCTGGGCATAC
1-R	GCAAGATGGAGGATCTCGTTCCC
2-F	GCGGTCTGAAGGAAGGAACCA
2-R	GTTTCGCTGAGGGATCGCTCA
3-F	GCCGGCTTCATATGGCGTAGATACG
3-R	GGGATGGCTGACCTGGAGATAGGG
4-F	GGGGCCCCCTCATATGGCGTAGAT
4-R	GGCATGTCCTTCTCCGGAAGCG
5-F	GCAGTGCAGGTGTCCTGAACAGAC
5-R	GCTCGCCATAACCTTCCATTCCA
6-F	GGGGCACAATATAATACTTATGGGAA
6-R	GGCACGGCACATGAGATCATG
7-F	GCATTCCTTGGGTTGTTGTCGC
7-R	GCAGCTTGTGCAATGGTAGCCAT
8-F	GCCGACCCGAGTAGAGTCAGGC
8-R	GTCCAGCTTGTCAATGGTAGCCA
<i>ACTIN</i> -F	GTATGTTGCTATCGAGGCTGTTCTTTC
<i>ACTIN</i> -R	TCTGTGAGGATCTTCATTAGGTGGTC
<i>ZmNPR1</i> -F	GATGCGGAATCCTATGGCGGTGG
<i>ZmNPR1</i> -R	ACACTGCCCTCTGCCTTGTCTTGC
<i>PAL</i> -F	TCCTGTCCGCCGTCTTCTGC
<i>PAL</i> -R	CGGGTTGTCGTTACGGAGTT

**1.2.4 植物材料的处理和半定量分析** 选取正常生长的齐 319 玉米植株, 四叶期分别使用去离子水、SA、MeJA、MDMV (Maize dwarf mosaic virus, 玉米矮花叶病毒)、BM (Bipolaris maydis, 玉米小斑病菌) 进行处理。对照、SA 及 MeJA 处理: 配制  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的水杨酸、 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  MeJA, 分别均匀喷洒于四叶期玉米叶片上, 分别在处理 1 h、6 h 和 12 h 后取样。MDMV 处理: 取 3 片含有玉米矮花叶病毒的病叶, 剪碎放入研钵中, 加入适量的  $0.02 \text{ mol/L}$  磷酸缓冲液 ( $\text{pH}=8$ ) 研磨, 过滤后, 滤液经

$8000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 所得上清用  $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液 (病汁液与缓冲液比例为 1:10) 稀释; 摩擦接种: 将四叶期玉米的倒 2、倒 3 叶片表面均匀撒上 600 目金刚砂; 左手托住叶片, 右手食指蘸取少量汁液, 从叶基向叶尖轻抹 2 次, 接种后立即用水将病汁液及金刚砂冲洗干净。BM 处理: 1) 孢子体培养: 将玉米小斑病原菌接种于灭菌煮熟的玉米粒中,  $28^\circ\text{C}$  扩大培养 2 周, 待产生大量孢子后, 用灭菌的蒸馏水洗下孢子, 过滤去除菌丝及培养基, 滤液即为侵染液; 2) 孢子体侵染: 将侵染液用灭菌蒸馏水 100 倍稀释, 加入 2% 蔗糖, 以促进病菌孢子萌发, 用微型喷雾剂均匀喷雾于四叶期玉米叶片上, 喷后立即用塑料袋套盆保温。

分别提取样品 RNA 并反转成 cDNA, 以玉米基因 *ACTIN* 为内参, 扩增引物如表 1。内参基因表达量调整一致后, 以相应内参所用模板量分别扩增基因 *ZmNPR1* 和 *PAL*, 分析这 2 个基因在不同处理下的表达趋势。

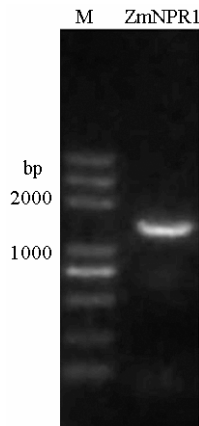
## 2 结果与分析

### 2.1 玉米 *NPR1* 基因的克隆

为了从玉米“齐 319”中克隆 *NPR1* 基因, 基于拟南芥和水稻 NPR 蛋白的保守基序列, 通过同源比对的方法从玉米中筛选到 8 个候选基因。结合 PCR 的方法对其进行扩增, 所用引物如表 1 所示, 扩增产物连接到中间载体, 阳性克隆进行测序。测序结果经过 NCBI 比对, 结果显示基于 1 号引物所得 PCR 产物 (图 1), 大小为 1434 bp, 和已公布的玉米 B73 中 *NPR1* 基因的蛋白同源性高达 99%。氨基酸序列分析显示其含有典型的 NPR 蛋白的保守结构域 BTB/POZ、ANK; 通过 ExPASy 在线软件分析, *ZmNPR1* 基因编码的蛋白质分子量约为 53.30 kD, 等电点为 5.68。

### 2.2 *NPR1* 基因的进化树构建

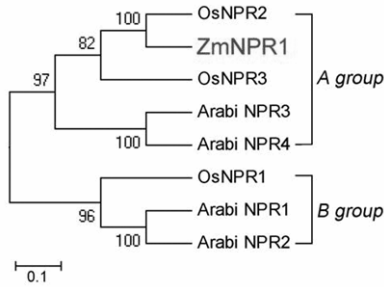
为了研究玉米 *NPR1* 基因的功能, 比对了模式植物拟南芥中 *NPR1* (NP\_176610)、*NPR2* (NP\_194342)、*NPR3* (NP\_199324)、*NPR4* (NP\_193701) 以及水稻中 *NPR1* (ABE11614)、*NPR2* (ABE11615)、*NPR3* (ABE11618) 蛋白序列, 利用 Mega 6.0 软件构建了玉米、拟南芥、水稻中 *NPR1* 及同源蛋白的进化树 (图 2)。结果显示拟南芥、水稻和玉米中 *NPR1* 分成 A、B 2 个组, 其中玉米 *ZmNPR1* 基因与水稻 *OsNPR2* 和 *OsNPR3* 以及拟南芥的 *NPR3* 和 *NPR4* 属于同一组, 进化树结果显示 *ZmNPR1* 与水稻 *OsNPR2* 同源性最高。



M: DNA Marker

图 1 基因 *ZmNPR1* 的 PCR 扩增

Figure 1 PCR amplified product of *ZmNPR1*



进化树分支上数字为 Bootstrap 值

The number above each branch represents bootstrap value

图 2 不同物种间 *NPR1* 及 *NPR1* 同源蛋白的进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of *NPR1* and *NPR1* homologues from different species

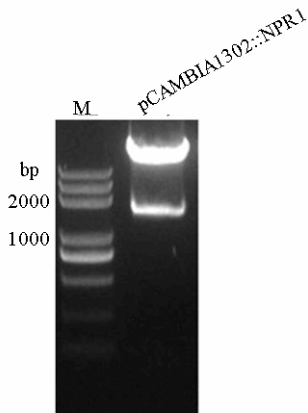


图 3 pCambia1302::NPR1-GFP 融合表达载体酶切结果

Figure 3 Digested result of pCambia1302::NPR1-GFP

### 2.3 *ZmNPR1* 的亚细胞定位分析

为了分析 *ZmNPR1* 蛋白的定位情况, 构建了融合表达载体 pCambia1302::NPR1-GFP, 经 *Kpn* I 与 *Xba* I 双酶切后, 产生目的条带, 结果如图 3 所示, 测序正确。结果表明已成功构建了融合表达载体, 可以用于其定位分析。

利用洋葱表皮细胞进行了亚细胞定位分析。大

量提取了含有空载体和融合载体质粒后, 通过基因枪的方法打入洋葱表皮细胞, 培养 48 h 后荧光显微镜观察。结果显示打入空载体质粒的洋葱在细胞中都有信号, 而打入含有目的基因 *NPR1* 的融合质粒, 信号位于细胞核中 (图 4), 这表明 *ZmNPR1* 定位于细胞核中。

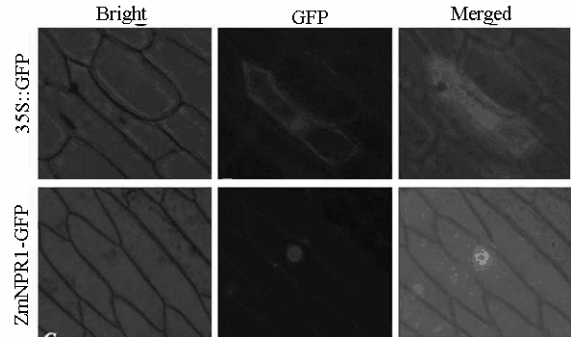


图 4 *ZmNPR1* 的亚细胞定位分析

Figure 4 Subcellular localization of *ZmNPR1* in onion epidermal cells by 35S promoter

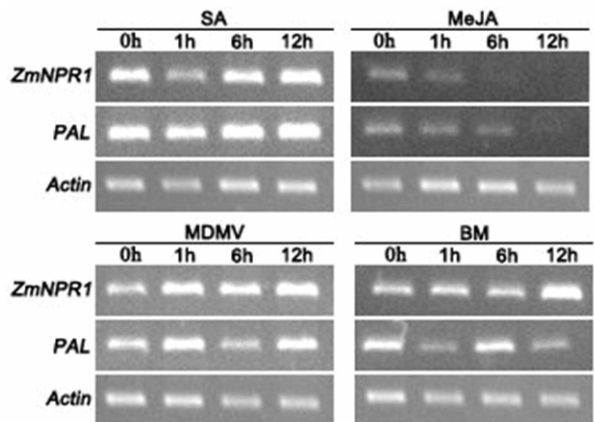


图 5 半定量分析玉米在不同时间段 SA、MeJA、MDMV 和 BM 处理下的表达情况

Figure 5 RT-PCR analysis of *ZmNPR1* and *PAL* expression in response to SA, MeJA, MDMV and BM of different time after treatment

### 2.4 *ZmNPR1* 的抗病性分析

玉米四叶期叶片经过 SA、MeJA、MDMV、BM 处理后 1 h、6 h 和 12 h 后取样。同时以玉米喷施去离子水作为对照。分别提取 RNA 做半定量 PCR 分析, 结果如图 5 所示。图中我们可以看出在水杨酸和病原微生物 (包括病毒类病原微生物玉米矮花叶病毒和真菌类病原菌玉米小斑病原菌) 的处理下, 随着处理时间的延长, 叶片中 *ZmNPR1* 基因和 *PAL* 基因的表达量都有明显的升高, 而在茉莉酸甲酯处理下, 叶片中的 *ZmNPR1* 和 *PAL* 基因的表达量随着处理时间的延长而下降。通过观察与抗病相关的关

键酶 *PAL* 表达基因的表达量的变化, 可以看出, *ZmNPR1* 基因与 *PAL* 基因的表达谱一致, 即 *PAL* 基因表达量升高, *ZmNPR1* 表达量也升高; *PAL* 基因表达量降低, *ZmNPR1* 表达量也降低。这说明玉米 *NPR1* 同样也参与到 SA 介导的抗病反应过程。

### 3 讨论

自 Cao 等首先从拟南芥中克隆出 *NPR1* 基因后<sup>[12]</sup>, 随后在多种植物中都发现了 *NPR1* 及其同源蛋白。研究发现 *NPR1* 作为抗病信号通路中的核心元件, 参与到多种植物和各种类型抗病性的调控通路<sup>[16,19]</sup>。

本研究通过生物信息学与分子生物学的方法从玉米“齐 319”自交系中克隆了 *NPR1* 及其同源序列, 1 号引物所得产物和 B73 中 *NPR1* 序列同源性最高, 达到 99%。其他 7 对引物所得目的条带其中 2 组是 *NPR1* 基因的部分序列, 其他 5 组引物所得产物大小和 B73 中 *NPR1* 序列同源性相差较大。因此 1 号引物所得基因命名为 *ZmNPR1*。序列分析显示该基因蛋白含有典型的 BTB/POZ 结构域及锚蛋重复序列(ANK)。研究表明, 拟南芥、水稻等植物 *NPR1* 编码的蛋白质中, ANK 保守域结构是 *NPR1* 与 TGA 转录因子相互作用的重要元件<sup>[22]</sup>。BTB 和 ANK 重复序列参与蛋白与蛋白之间的互作<sup>[22]</sup>, 推测 *NPR1* 可能通过与其他蛋白的相互作用参与调节植物防卫反应。玉米 *NPR1* 蛋白在结构上的保守性对行使功能具有重要意义, 其在玉米中的具体作用需进一步研究。

进化树分析显示, 玉米 *NPR1* 和水稻 *NPR2*、*NPR3* 拟南芥中 *NPR3*、*NPR4* 亲缘关系较近, 属于同一组。其中和水稻中 *OsNPR2* 同源关系最近, 达到 100%。研究显示 *OsNPR2*、*OsNPR3* 基因受到水稻白叶枯病菌、稻瘟病菌、苯并噻二唑、茉莉酮酸甲酯和乙烯诱导表达<sup>[23]</sup>; 研究发现拟南芥 *NPR3* 和 *NPR4* 是 SA 的受体, 与 SA 结合后作为泛素 E3 连接酶 Cullin 3 的转接蛋白(adaptor)从而介导 *NPR1* 降解<sup>[24]</sup>。另外在拟南芥 *npr3/npr4* 双突变体中, *NPR1* 蛋白含量会增高但对 SAR 反应并不敏感<sup>[24]</sup>。这表明 *NPR3* 和 *NPR4* 与 *NPR1* 的生物学功能不同, 可以通过与 SA 的结合对 *NPR1* 介导的抗病反应起到十分重要的调控作用。目前水杨酸介导的小麦抗病网络并不明确, 而在玉米中 *ZmNPR1* 是否分别有 *AtNPR3* 和 *AtNPR4* 类似的功能, 有待深入研究。

研究报道 *NPR1* 可作为转录因子调控 *PR* 基因的表达, 同时通过反馈调节 SA 的浓度, 减少对植

物的毒害<sup>[25]</sup>。*ZmNPR1* 亚细胞定位结果显示 *ZmNPR1* 定位于细胞核中, 其是否也执行转录因子的功能有待进一步研究。

研究发现 MeJA 也能通过调控 *NPR1* 的表达诱发抗病通路, 这种依赖于 MeJA 介导的抗病路径与 SA 介导的抗病路径有所不同大量的证据表明 SA 信号转导途径与 JA 类和 ET 类介导的信号转导途径具有拮抗作用<sup>[26]</sup>。SA 的积累可以抑制 JA 调节基因的表达和 JA 的生物合成。突变体实验数据显示 SA 对 JA 信号传导的抑制最为普遍, 有趣的是, 在研究 *npr1* 突变体中 SA 和 JA 的信号传导时, 发现这一拮抗作用的发生也需要 *NPR1* 的参与<sup>[27]</sup>。同样半定量 PCR 实验结果也显示 *ZmNPR1* 基因受到 SA、MDMV 和 BM 的诱导, 表达水平逐渐增强; 当经 MeJA 处理后, *ZmNPR1* 基因表达受到抑制。同样 *PAL* 基因的表达趋势和 *ZmNPR1* 相似。这些结果暗示 *ZmNPR1* 参与到 SA 和 JA 调控的交叉抗病通路途径。其作用途径和机制还有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Durrant W E, Dong X N. Systemic acquired resistance [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2004, 42: 185-209.
- [2] Ohashi Y, Matsuoka M. Localization of pathogenesis-related proteins in the epidermis and intercellular spaces of tobacco leaves after their induction by potassium salicylate or tobacco mosaic virus infection [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1987, 28(7): 1227-1235.
- [3] White R F, Neth J. Serological detection of pathogenesis-related proteins III [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 1983, 89(6): 311.
- [4] Dong X N. *NPR1*, all things considered [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2004(7): 547-552.
- [5] Baebler S, Stare K, Kova M, et al. Dynamics of responses in compatible potato-potato virus Y interaction are modulated by salicylic acid [J]. *PloS one*, 2011, 6(12): e29009.
- [6] Bol J F, Van Kan J A L. The synthesis and possible functions of virus-induced proteins in plants [J]. *Microbiological Sciences*, 1988, 5(2): 47-52.
- [7] Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, et al. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance [J]. *Science*, 1993, 261: 754-756.
- [8] Mukhtar M S, Nishimura M T, Dangl J. *NPR1* in plant defense: It's Not over'til It's turned over [J]. *Cell*, 2009, 137: 804-806.
- [9] Cao H, Bowling S A, Gordon A S, et al. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance [J]. *Plant Cell*, 1994, 6(11): 1583-1592.
- [10] Dong X. Generation of broad-spectrum disease resistance by over expression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95: 6531-6536.
- [11] Aravind L, Koonin E V. Fold prediction and evolutionary

- analysis of the POZ domain: structural and evolutionary relationship with the potassium channel telramefization domain [J]. *J Mol Biol*, 1999, 285: 1353-1361.
- [12] Cao H, Glazebrook J, Clarke J D, et al. The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats [J]. *Cell*, 1997, 88: 57-63.
- [13] Mou Z L, Fan W H, Dong X N. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes [J]. *Cell*, 2003, 113: 935-944.
- [14] Chern M, Fitzgerald H A, Canlas P E, et al. Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2005, 18: 511-520.
- [15] Zhang L, Zhang Y, Shi J, et al. Molecular cloning and characterization of a novel *NPR1* gene from *Nicotiana glutinosa* [J]. *Acta Phytopathol Sin*, 2009, 39: 482-490.
- [16] 杨在东, 马信, 吴世文, 等. 小麦 *NPR1-like* 基因的克隆及赤霉菌诱导下的表达分析[J]. *作物学报*, 2013, 39(10): 1775-1782.
- [17] Zhang Y, Wang X, Cheng C, et al. Molecular cloning and characterization of GhNPR1, a gene implicated in pathogen responses from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Biosci Rep*, 2008, 28: 7-14.
- [18] Malnoy M, Jin Q, Borejsza-Wysocka E E, et al. Overexpression of the apple MpNPR1 gene confers increased disease resistance in *Malus × domestica* [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2007, 20: 1568-1580.
- [19] Chern M S, Fitzgerald H A, Yadav R C, et al. A disease resistance pathway in rice similar to the mediated pathway in *Arabidopsis* [J]. *Plant Journal*, 2001, 27 (2): 101-113.
- [20] Pieterse C M J, Van Wees S C M, Van Pelt J A, et al. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 1571-1580.
- [21] Schnable P S, Ware D, Fulton R S, et al. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics [J]. *Science*, 2009, 326(5956): 1112-1115.
- [22] Gu J N, Li D P. Preliminary studies on the function of an ANK6 interacting protein in *Arabidopsis* [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2011.
- [23] Yuan Y, Zhong S, Li Q, et al. Functional analysis of rice NPR1 - like genes reveals that OsNPR1/NH1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2007, 5(2): 313-324.
- [24] Fu Z Q, Yan S P, Saleh A, et al. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants [J]. *Nature*, 2012, 486: 228-233.
- [25] Le Henanff G, Heitz T, Mestre P, et al. Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression [J]. *BMC Plant Biology*, 2009, 9(1): 54.
- [26] 赵利辉, 邱德文, 刘峥. 植物 SAR 和 ISR 中的乙烯信号转导网络[J]. *生物技术通报*, 2006(3): 28-32.
- [27] Glazebrook J, Chen W, Estes B, et al. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping [J]. *Plant Journal*, 2003, 34: 217-228.