DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.01050

过表达 *TaJRL53* 基因提高了小麦赤霉病抗性

陈同睿 罗艳君 赵潘婷 贾海燕* 马正强

南京农业大学农学院 / 作物遗传与种质创新国家重点实验室 / 江苏省现代作物生产协同创新中心, 江苏南京 210095

摘要: Jacalin-related lectins (JRLs)是一种含有 Jacalin 结构域的植物凝集素,在植物应对生物胁迫和非生物胁迫过程中发挥重要作用。根据其糖结合特性被划分为半乳糖特异性 JRL (gJRLs)和甘露糖或葡萄糖特异性 JRL (mJRLs)两类。前期研究表明普通小麦 *TaJRL53* 编码一个具有 Jacalin 结构域和 Dirigent 结构域的蛋白,并能在赤霉菌的诱导下上调表达。由赤霉菌侵染引起的小麦赤霉病是一种毁灭性的病害,它不仅能够导致大幅度减产,而且使感病的麦粒品质下降。受真菌毒素污染的籽粒,严重影响人畜健康。为分析该基因在抗赤霉病方面的作用,本研究利用 VIGS 系统在小麦中沉默 *TaJRL53*,导致了其对赤霉病的抗性减弱。通过基因枪的方法将该基因的过量表达载体导入到感赤霉病小麦品种中,增强了赤霉病抗性,其病小穗数,病轴长都明显缩短。在赤霉菌侵染后,ROS 合成途径相关基因、JA 信号通路中的主要标志基因、JA 合成基因及病程相关蛋白基因在 *TaJRL53* 过量表达的转基因植株中明显高于它们在野生型中的表达量,因此推测 *TaJRL53* 提高小麦赤霉病抗性可能跟 ROS 和 JA 合成,JA 信号转导途径有关。本研究增进了对小麦 JRLs 家族基因功能的了解,为解析 *TaJRL53* 抗赤霉病机制奠定了基础。

关键词: 小麦; Jacalin-related lectins; 赤霉病抗性; ROS; JA 信号通路

Overexpression of *TaJRL53* enhances the *Fusarium* head blight resistance in wheat

CHEN Tong-Rui, LUO Yan-Jun, ZHAO Pan-Ting, JIA Hai-Yan*, and MA Zheng-Qiang

College of Agriculture, Nanjing Agricultural University / State Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement / Jiangsu Collaborative Innovation Center for Modern Crop Production, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: Jacalin-related lectins (JRLs) are a group of plant lectins with jacalin protein domain, which play important roles during plant response to biotic and abiotic stress. According to their carbohydrate binding specificities, the JRLs were described as two types: galactose-binding lectins (gJRLs) and mannose-binding jacalins (mJRLs). Previous studies have shown that *TaJRL53* encodes a protein with Jacalin and Dirigent domains and can be up-regulated by *Fusarium graminearum* infection. Wheat FHB induced by this pathogen is a disastrous disease, which not only reduces the grain yield, but also contains deoxynivalenol and other toxins, which seriously affect the health of human and livestock. To dissect the gene's function in FHB resistance, we silenced and overexpressed the *TaJRL53* in wheat respectively. As a result, attenuating *TaJRL53* increased susceptibility to *Fusarium graminearum*. And susceptible wheat transformed with *TaJRL53* over-expression showed higher *Fusarium* head blight resistance, the number of diseased spikelets (NDS) and length of diseased spike rachis (LDR) of transgenics wheat with *TaJRL53* overexpression were significantly reduced than those of wild type. After *Fusarium graminearum* infection, the expression of ROS synthesis pathway, JA synthesis and signaling pathways marker genes, and disease related genes in *TaJRL53* over-expression transgenic plants were higher than those in non-transgenic control. These results suggest that *TaJRL53* enhanced the FHB resistance in wheat through regulating ROS synthesis pathway and JA signal transduction pathways. This study enhanced the understanding of wheat JRLs family genes' function and laid a foundation for the mechanism dissection of *TaJRL53* resistant to FHB in wheat.

Keywords: wheat; Jacalin-related lectins; FHB resistance; ROS; JA pathway

本研究由国家重点研发计划项目(2016YFD0101004)资助。

The study was supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0101004).

* 通信作者(Corresponding author): 贾海燕, E-mail: hyjia@njau.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: 2017101089@njau.edu.cn

Received (收稿日期): 2020-06-17; Accepted (接受日期): 2020-09-13; Published online (网络出版日期): 2020-09-30.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200930.1049.002.html>

植物在自然界生长过程中不断受到各种病原物的侵袭。在长期的进化过程中,植物与病原物之间互相适应、协同进化。植物通过一系列信号传递激发自身的防御体系,从而产生抗病反应,例如水杨酸、茉莉酸、乙烯、钙离子等在抗病信号转导途径中扮演着至关重要的作用^[1-2]。小麦,作为世界三大粮食作物之一,产量仅次于玉米和水稻。在过去的几十年间,在小麦种植面积没有增加的前提下,截至 2017 年全球小麦总产量增长超过 50%^[3]。然而,它的生长过程受各种病原菌的侵害,包括锈病、白粉病、赤霉病、纹枯病等。近年来,随着全球气候变化、小麦耕作制度及农业生产技术变化的影响,小麦赤霉病的发生频率越来越高,病害发生的面积逐渐增加。在我国,赤霉病主要发生在长江中下游麦区、华南冬麦区和川滇冬麦区等。小麦赤霉病的发生不仅仅降低小麦的产量和品质,更为严重的是感赤霉病的籽粒含有赤霉菌分泌的多种毒素如脱氧雪腐镰刀菌烯醇,严重影响人畜健康^[4-5]。鉴于赤霉病对小麦生产和粮食安全造成的严重威胁,该病害引起了人们越来越多的关注。

凝集素是一类广泛存在于生物体内的糖蛋白或糖特异结合蛋白,与机体的多种生理功能密切相关^[6]。植物凝集素按照同源性、种属来源及进化关系的差异可分为 12 个不同家族^[7-8], Jacalin-related lectins (JRLs) 是植物凝集素超家族中的一个新家族,因被发现于木菠萝而被命名^[9]。根据其糖结合特性被划分为半乳糖特异性 JRL (gJRLs) 和甘露糖或葡萄糖特异性 JRL (mJRLs),前者是桑科植物特异的,主要储存于液泡中^[10];后者广泛分布于单子叶植物、双子叶植物、苏铁植物和蕨类植物,大多数定位于细胞质和细胞核中。JRLs 蛋白结构具有多样性,可包含一个或多个 Jacalin 结构域^[8,11],也可与其他结构域嵌合。其中与疾病响应元件 Dirigent 嵌合的 JRL 是单子叶植物特有的类型,在单子叶植物中广泛存在,又称为单子叶嵌合凝集素^[12]。

迄今为止,在植物中已有功能研究报道的 JRLs 超过 26 个^[13],它们大多数都与抗病、抗逆及胁迫压力的响应相关,但是它们抗病/逆的机制却各不相同。比如,从红芸豆中提取的一种同源二聚凝集素,通过其自身的有毒肽对真菌 *Fusarium oxysporum*、*Coprinus comatus* 和 *Rhizoctonia solani* 的生长产生抑制作用^[14]。LecRK-V.5 通过负调控拟南芥的气孔免疫,从而对丁香假单胞菌和胡萝卜软腐菌的生长产生影响^[15-16]。JAX1 介导的免疫抗性不同于其他病毒

抗性机制,它独立于传统抗性(R)蛋白介导的抗性和植物防御激素信号传导^[17-18]。辣椒中的甘露糖结合凝集素基因 CaMBL1 通过识别高甘露糖型 N-聚糖调控 PCD,进而对微生物病原体的防御反应^[19]。凝集素受体激酶 ERK1 在 LysM 区域抗真菌 MAMP 信号感知中发挥重要作用^[20-21]。RTM1 通过与自身或 RTM3 相互作用来限制植物病毒的长距离移动^[22-24]。PYK10 通过与不同的 JRLs (JAL31 和 JAL23) 互作,控制 PYK10 聚合物的尺寸,从而在防御反应中发挥作用^[25]。OsJAC1 具有对多种病原菌的广谱抗性,这种抗性是由自身的 Jacalin 和 Dirigent 两个结构域相互作用提供^[26], *OsMBL1* 可增强对稻瘟病菌的抗性,其抗性的产生是由于与稻瘟病基因 *MoChil* 竞争几丁质,从而触发水稻细胞中的 ROS 反应,并且通过积极调控 SA 和 ABA 响应基因,进而通过参与 PTI 途径防御稻瘟病菌的侵染^[27]; *LEM2* 参与了大麦系统获得性抗性^[20]。

在小麦中,目前为止仅有以下 4 个 JRL 基因被克隆并进行了功能及机制方面的探索: *TaJRL1* 与小麦白粉菌和赤霉菌抗性有关,被认为是水杨酸和茉莉酸植物防御信号机制的组成部分^[28]; *TaWCI-1* 基因响应白粉菌的侵染^[29], *TaHfr-1* 对黑森麦秆虫幼虫的发育有抑制作用^[30]; *TaJA1* 是 *OsJAC1* 在小麦中的同源基因,过量表达该基因可提高烟草对多种病害的抗性^[31]。此外,也有研究者在大麦、水稻、高粱、小麦和一些草属的 NBS-LRR 区域发现了整合的 Jacalin 结构域,这类整合结构域,有些可以诱捕入侵的病原体,启动相应的防御响应^[32-33]。我们前期研究从小麦基因组中鉴定获得了 67 个 JRL 基因,其中 *TaJRL53* 是一个单拷贝基因,位于小麦 4A 染色体长臂上,属于与 Dirigent 结构域嵌合的 mJRLs,通过电子表达及 RT-PCR 检测到 *TaJRL53* 可对赤霉菌的侵染产生响应,并在 MeJA 和 SA 激素处理后上调表达^[6]。本研究拟通过 VIGS 技术和基因枪介导的遗传转化技术进一步探究 *TaJRL53* 的生物学功能以及抗性机制。

1 材料与方法

1.1 植物材料

普通小麦中国春和望水白用于该基因的克隆,地方品种望水白用于基因的组织特异性表达分析;中抗赤霉病材料 SSD006 用于 VIGS 实验;感赤霉病材料 Bobwhite 和 PH691 用于稳定遗传转化。组织特异性表达分析的材料:取望水白正常生长季节苗期

根、茎、叶和开花后 5 d 的根、茎、叶、穗于液氮冻存。转基因植株中 *TaJRL53* 的表达所用的材料: T_0 代转基因植株成株期的叶片。亚细胞定位材料用新鲜的洋葱。

1.2 基因的克隆

参照文献[31]获得的 *TaJRL53* 基因序列设计特异引物(F 引物: 5'-ATGGCCACAACCACCG-3'; R 引物: 5'-GATGGTATAAACACCAATCGAAG-3'), 从中国春的 cDNA 中扩增 *TaJRL53* 的开放读码框。

1.3 总 RNA 的提取、cDNA 的合成、半定量 PCR 和实时定量 PCR

利用 TRIzol 试剂(Invotrogen, Carlsbad, CA)按照操作说明提取总 RNA, 所有的 RNA 材料均用 DNaseI (Fermentas, Canada)消化以确保完全去除 DNA 污染。随后用 M-MLV 反转录酶(Promega, USA)按照操作说明合成 cDNA。

半定量 RT-PCR 扩增体系为 25 μ L, 反应程序为 94 预变性 3 min, 94 变性 30 s, 退火 30 s (退火温度视具体引物而定), 72°C 延伸 (延伸时间视扩增片段长度而定), 25~30 个循环 (因基因的表达丰度不同而异), 最后 72°C 延伸 5 min。扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶中电泳检测。以小麦组成型表达基因 *TaActin* 作为内参。

参照 THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyoba, Japan) 使用说明, 实时定量 RT-PCR 反应体系为 20 μ L, 包括约 5 ng 模板、10 μ L SYBR-Green PCR Mastermix (Toyoba, Japan) 和各 8 pmol 的正反向引物。以 *TaActin* 作为参照, 每个目标基因 3 个重复, 相对表达量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算[32], 用 StepOnePlus Real-time PCR Systems (Applied Biosystems) 进行反应。按[33]中所用引物对信号通路中的标志基因的表达进行检测, 检测 *TaJRL53* 表达的正向引物为 5'-GTTGCGCAAACGCACGGTA-3', 反向引物为 5'-CCCAGTCATTATCTGCTTCATCCTC-3'。

1.4 载体构建

1.4.1 瞬时表达载体的构建 用 KOD FX DNA 聚合酶从望水白穗部 cDNA 中扩增 *TaJRL53* 的编码区 (不含终止子), 正向引物为 5'-CTAGTCTAGAAATGGCCACAACCAC-3' (下画线表示 *Xba* I 酶切位点), 反向引物为 5'-CGCGGATCCGATGGTATAAACA-3' (下画线表示 *Bam* H I 酶切位点)。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳分离检测后, 用 DNA 凝胶回收试剂盒回收, 将回收到的扩增产物用 *Xba* I 和 *Bam* H I 酶

切, 回收定量后与经过 *Xba* I 和 *Bam* H I 酶切过的 pEGFP 表达载体按 3 : 1 摩尔比混合, 在 4°C 条件下用 T₄-DNA 连接酶(Promega, USA)连接过夜, 连接产物用热击法转入大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 。阳性克隆送上海华大公司测序验证。

1.4.2 BSMV 沉默载体的构建 本实验室内野生型 BSMV ND18 α 、 β 及 γ 载体引自美国堪萨斯州立大学 Scofield 实验室。利用 DNA 聚合酶从中国春的 cDNA 中扩增 *TaJRL53*, 上游引物 5'-CCCGTTAATTAA GCCACAACCACCGAAGAACC-3' (下画线表示 *Pac* I 酶切位点), 下游引物为 5'-TATAGCGGCCGCGCCAG CACCGTCATAGACACCCC-3' (下画线表示 *Not* I 的酶切位点), 将 PCR 产物和野生型 BSMV ND18 γ 用 *Pac* I 和 *Not* I (Promega, USA) 双酶切, 将载体去磷酸化, 分别回收酶切后的 PCR 产物和质粒, 并按 3 : 1 的摩尔比混合, 在 4°C 条件下用 T₄-DNA 连接酶 (Promega, USA) 连接过夜。用热击转化法将连接产物转入大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 。挑取阳性克隆送上海华大基因科技股份有限公司测序, 测序结果正确, 获得可用于 VIGS 转化的载体。

1.4.3 稳定表达载体的构建 用 *TaJRL53* 的特异引物从中国春的 cDNA 中扩增 *TaJRL53* 的开放读码框, 正向引物为 5'-TACGCTGCAGATGGCCACAAC CACCG-3', 反向引物为 5'-ATGCCTGCAGGATGGTA TAAACACCAATCGAAG-3' (下画线为 *Pst* I 的酶切位点)。将扩增片段插入到中间载体 pUT (pTA2-Ubi-Ter) 中构建 Ubi 驱动的表达式, 然后将 Ubi::TaJRL53-Ter 表达式用 *Hind* III 切下, 再插入到表达载体 pUCBS 中, 构成用于基因枪转化的 *TaJRL53* 稳定表达载体 (图 1)。

图 1 *TaJRL53* 过量表达载体结构图

Fig. 1 Scheme of the *TaJRL53* overexpression vector

1.5 亚细胞定位

剥去新鲜洋葱最外的两层鳞茎, 用尖嘴镊子小心撕取完好鳞茎的内表皮, 平铺于 1/2 MS 固体培养基上, 注意要将内表面朝上, 且要平铺于培养皿中心位置。盖上培养皿, 黑暗中 25°C 恒温预培养 2~4 h。参照文献[34]进行质粒包裹和基因枪轰击。

将洋葱表皮细胞置于 25°C 恒温培养箱中暗培养 16~18 h, 在激光共聚焦显微镜下观察荧光并照相记录。

1.6 VIGS

1.6.1 体外转录物的合成 提取野生型 BSMV ND18 α 、 β 、 γ 及 BSMV:*TaJRL53* 的质粒, 分别用 *Mlu* I 线性化 BSMV ND18 α 、 γ 及 BSMV:*TaJRL53* 质粒 DNA, *Spe* I 线性化 BSMV ND18 β 质粒 DNA, 用 1% 的凝胶电泳检测线性化水平。待线性化完全后用酚、氯仿抽提、纯化, 用 RNase-free 水溶解, 调整浓度为 0.2~1.0 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ 。以抽提纯化的质粒为模板, 用 T7-DNA 依赖的 RNA 聚合酶 (mMessage mMachine T7 Kit; Ambion) 进行体外转录。转录产物用 1% RNA-free 的凝胶电泳跑胶, EB 染色后在紫外灯下拍照检测 RNA 质量。

野生型 BSMV ND18 α 、 β 及 γ 为模板的体外转录物与 FES 按 1 : 1 : 1 : 25 的比例混合为空 BSMV 病毒对照, 同样以野生型 BSMV ND18 α 、 β 及 BSMV:*TaJRL53* 为模板的体外转录物与 FES 也按 1 : 1 : 1 : 25 的比例混合, 取 8 μL 上述两种混合液均匀涂于穗部, 同时单独涂抹 FES 缓冲液做空白对照。

1.6.2 体外涂抹 在抽穗期选取长势良好且大小一致的穗子, 分别涂抹 FES 缓冲液、FES 缓冲液和 BSMV 病毒混合液, FES 缓冲液和 BSMV:*TaJRL53* 病毒混合液, 以只涂抹 FES 缓冲液和涂抹 FES 缓冲液、BSMV 病毒混合液的植株作为对照组, 涂抹 FES 缓冲液和 BSMV:*TaJRL53* 病毒混合液的植株作为实验组, 每种病毒混合液至少接种 10 株, 3 次重复。

1.7 小麦的遗传转化及转基因植株的检测

取开花后 14 d 左右的小麦种子脱粒。在无菌条件下将脱粒的种子置于灭菌小罐中, 用 70% 乙醇浸泡 5 min, 无菌水冲洗 2~3 次; 2% 的 NaClO 浸泡 8 min, 无菌水冲洗 3~4 次。于 2 mg L^{-1} 2,4-D 的 MS 培养基上, 25 °C 暗培养 3~5 d 后, 幼胚经过脱分化形成愈伤组织。参照文献[34]的方法基因枪轰击, 轰击后的小麦愈伤继续在 25°C 黑暗培养箱培养 16~18 h, 然后转移至诱导培养基上进行暗培养 14 d。将愈伤组织转移到 1 mg L^{-1} KT 和 20 mg L^{-1} 筛选剂 G418 的分化筛选培养基上, 在 25°C、12 h 光照条件下培养, 待愈伤分化出绿点后进行继代培养, 筛选 4 周后将绿苗进行生根培养, 2 周后移栽到土壤中。

采用 SDS 法提取受体材料和小麦再生植株的 DNA^[35], DNA 稀释后跑电泳检测质量和浓度, 用

Ubiquitin 的正向引物 5'-ATCTCCCCCAAATCC ACCCG-3' 和 *TaJRL53* 基因的反向引物 5'-ATGCCTG CAGGATGGTATAAACACCAATCGAAG-3' 进行 PCR 检测, 同时以含有 *TaJRL53* ORF 的载体质粒为阳性对照, 未转化的野生型植株 DNA 为非转基因对照, 水为空白对照。PCR 总体积为 25 μL , 包含模板、正反引物、*r-Taq* DNA 聚合酶和 10 $\times$ PCR 缓冲液。PCR 程序包括: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 40 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min, 36 个循环, 最后 72°C 延伸 5 min。PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离检测, 用 EB 染色后在紫外灯下观察结果并照相。

1.8 赤霉病抗性鉴定

1.8.1 小麦叶片的赤霉病抗性鉴定 取 T_1 代转基因株系返青至拔节期的小麦叶片接种赤霉菌孢子液, 孢子液为 F15、F609、F7136 及 *F. graminearum* tri5-GFP 菌株的分生孢子混合液, 接种时在叶片表面用枪头轻轻划伤, 悬空放置在培养基中间, 然后接种 6 μL 浓度为 1×10^6 个 mL^{-1} 赤霉菌分生孢子的菌液。接种 36 h 后观察赤霉菌菌丝的侵染情况。实验设置 3 个重复, 每个重复中各接种 5 个叶片, 差异显著性用 *t*-test 进行检验。

1.8.2 小麦穗部的赤霉病抗性鉴定 采用单花滴注法对实验组和对照组长势一致的穗子接种赤霉菌, 具体方法参照文献[36], 每个处理至少接种 15 个穗子, 接种后 7 d 和 14 d 调查并记录病小穗数和病轴长, 每个转基因株系至少接种 10 个穗子, 差异显著性用 *t*-test 进行检验。21 d 时对接种的穗子进行拍照。

2 结果与分析

2.1 *TaJRL53* 的克隆和组织表达特异性

利用 *TaJRL53* 特异引物从普通小麦中国春穗部 cDNA 中克隆获得了 1056 bp 的全长序列, 该序列与抗赤霉病种质望水白中的序列信息一致, 说明该基因序列在抗感材料中没有差异。对 *TaJRL53* 基因在苗期和开花期各组织中的表达进行分析, 以 *TaActin* 作为参照, 结果如图 2 所示, 苗期主要在茎和叶片中表达(图 2-A), 开花期的根茎叶穗 4 个组织中, 穗部表达量最高(图 2-B)。

2.2 *TaJRL53* 的亚细胞定位

为了研究 *TaJRL53* 蛋白在细胞中的表达部位, 以 PMD19-EGFP (35S::GFP) 作为对照, 将 *TaJRL53* 的 GFP 瞬时表达载体 (35S::TaJRL53-GFP) 转入洋葱

图 2 *TaJRL53* 组织表达特异性分析
Fig. 2 Tissue-specific expression of *TaJRL53*
A: 苗期; B: 开花期。标尺为 50 μm。A: seedling stage; B: flowering stage. Bar=50 μm.

表皮细胞后,在激光共聚焦显微镜下观察,*TaJRL53*与 GFP 均在整个细胞中发出绿色荧光,尤其在细胞核上的荧光更为明显,表明 *TaJRL53* 分布于细胞质及细胞核上(图 3),是一个核-质蛋白,与 mJRLs 的亚细胞定位特点一致。

2.3 VIGS 介导 *TaJRL53* 沉默后降低了植株赤霉病的抗性

接种 10 d 后,涂抹 BSMV 病毒和 BSMV:*TaJRL53* 病毒的麦穗出现病毒侵染后的表型。采用 RT-PCR 法检测 *TaJRL53* 在籽粒中的表达水平,与接种 FES 缓冲液和 BSMV 病毒的对照植株相比,接种 BSMV:*TaJRL53* 病毒的植株中的 *TaJRL53* 的表达量显著降低,表明 *TaJRL53* 的表达被成功抑制(图 4-A)。各挑选长势一致的 15 个植株用单花滴注法接种赤霉菌。接种 3 d 后,所有接种小穗可见明显的接种点。第 7 d,涂抹 BSMV:*TaJRL53* 病毒的植株,其接种小穗上的赤霉菌由接种点扩展到邻近小穗,穗轴呈褐色。至接种 15 d,只涂抹 FES 缓冲液、涂抹 FES 缓冲液和 BSMV 空载病毒混合液及 FES 缓冲液

和 BSMV:*TaJRL53* 病毒混合液的植株病小穗数的平均值分别为 1.3 个、1.3 个、2.4 个(图 4-B),差异达显著水平($P < 0.05$);病轴长分别为 0.2、0.3、1.3 cm(图 4-C),差异达极显著水平。接种 21 d 后,涂抹 FES 缓冲液、FES 缓冲液和 BSMV 病毒的混合液及 FES 缓冲液和 BSMV:*TaJRL53* 病毒混合液的植株病小穗数和病轴长差异最为显著(图 4-D),平均病小穗数分别为 1.6 个、1.5 个和 4.6 个(图 4-B);平均病轴长分别为 0.3、0.3 和 2.1 cm(图 4-C)。

综上所述,VIGS 介导中抗赤霉病小麦 SSD006 中的 *TaJRL53* 沉默后,小麦植株对赤霉病的抗性明显降低,认为 *TaJRL53* 对小麦赤霉病抗性有重要影响。

2.4 小麦稳定转化及阳性植株的基因型和表型鉴定

采用基因枪法将 *TaJRL53* 过量表达载体导入到感赤霉病小麦品种 Bobwhite 和 PH691 中,经愈伤诱导和连续的 G418 筛选后,对 T_0 代抗性植株进行分子检测,结果共获得 6 株以 Bobwhite 为受体的转基因

图 3 *TaJRL53*-GFP 融合蛋白在洋葱表皮细胞中的表达
Fig. 3 Expression of *TaJRL53*-GFP fusion protein in onion epidermal cells

图 4 *TaJRL53* 沉默后穗部的赤霉菌抗性

Fig. 4 The FHB resistance of spikes after *TaJRL53* silenced

A: 涂抹病毒后 *TaJRL53* 在穗部的表达; B 病小穗数; C: 病轴长; D: 穗部病症。图 B 和 C 中括号里的数值表示调查的样本数。*, *** 分别表示在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.001$ 水平的差异。

A: Expression level of *TaJRL53* in spike after inoculation with virus; B: Number of disease spikelet; C: Length of diseased rachides; D: Disease symptoms of spikes; The numbers in brackets show the number of samples. * and *** represent significant difference at level $P < 0.05$ and $P < 0.001$ (Student's *t*-test).

因植株, 1 株以 PH691 为受体的转基因植株(图 5-A)。利用 RT-PCR 分析 *TaJRL53* 在各转基因植株中的表达水平, 结果表明 7 个转基因植株的表达都明显高于受体, 以 Bobwhite 为受体的转基因植株中编号

为 1 和 2 的转基因植株表达量最高, 6 最低, 以 PH691 为受体的转基因植株 7 中的表达水平低于以 Bobwhite 为受体的 1~5 号植株), 略高于 6 号植株(图 5-B)。

图 5 T_0 代转基因植株的 PCR 鉴定(A)和 *TaJRL53* 的表达水平(B)

Fig. 5 PCR test and expression level of *TaJRL53* in T_0 transgenic plants with *TaJRL53* overexpression

M: 分子量 marker; 1~6: 以 Bobwhite 为受体的转基因植株; 7: 以 PH691 为受体的转基因植株; Ph: PH691; Bob: Bobwhite; H: 水对照; P: 阳性对照;

M: marker; 1~6: transgenic plants from Bobwhite; 7: transgenic plant from PH691. PH: PH691; Bob: Bobwhite; H: H₂O; P: positive control.

为探究 *TaJRL53* 过量表达植株对赤霉病的抗性, 取纯合转基因 T_1 代株系六叶一心期的叶片在离体条件下接种含 GFP 基因的赤霉菌, 36 h 后在荧光显微镜下观察发现, 非转基因对照 Bobwhite 与以其为受体的转基因植株叶片均能观察到绿色荧光, 但转基因植株叶片上的荧光与对照相比明显减弱(图 6-A)。与对照菌丝完全遮盖接种点相比, 转基因株系仅能看见接种点, 其中 Bobwhite 为受体的 1、2 和 4 号株系病斑面积显著减小, 差异在 $P < 0.01$ 水平显著; 编号为 3

和 5 的株系病斑面积在 $P < 0.05$ 水平显著(图 6-B)。阴性对照 PH691 和以其为受体的 7 号转基因植株在接种之后菌丝均沿接种点向四周扩散, 但转基因植株菌丝扩散程度与对照相比较轻, 其病斑面积的平均值与对照相比小 20%, 差异在 $P < 0.01$ 水平显著(图 6-A, B)。

对纯合 T_1 代转基因株系穗部采用单花滴注法接种赤霉菌, 接种 10 d 后, 未转基因对照穗部的赤霉菌由接种点开始向临近小穗蔓延, 但转基因株系并

未出现明显的赤霉菌扩展现象。接种 14 d 后, 转基因株系与非转基因对照的病小穗数和病轴长差异显著(图 6-C, D, E), 其中非转基因的 Bobwhite 病小穗数平均为 4.2 个, 病轴长平均为 3.0 cm, 转基因株系的病小穗数平均值在 1.7~2.0 个之间, 病轴长在 1.4~2.5 cm 之间; 对照 PH691 的病小穗数与病轴长的平均值分别为 5.9 个和 4.7 cm, 但以 PH691 为受体的转基因植株的病小穗数和病轴长的平均值分别为 1.0 个和 1.6 cm, 与对照相比, 转基因植株的病小穗数与病轴长差异均在 $P < 0.001$ 水平极显著(图 6-D, E)。

2.5 *TaJRL53* 过量表达的转基因植株中抗病信号途径相关基因的表达

为探究 *TaJRL53* 过量表达的转基因植株提高赤霉病抗性的分子机制, 对主要抗病信号途径 SA、JA、ROS、 Ca^{2+} 转运信号通路和木质素合成途径的

标志基因进行了赤霉菌诱导后的表达分析。如图 7 所示, 当赤霉菌侵染 *TaJRL53* 过表达的转基因植株 24 h 时, JA 信号转导途径中的基因 *12-OPR3*、*ACO* 以及效应基因 *ERF1*、病程相关蛋白基因 *PR-3* 的表达均显著提高(图 7-A~D)。对 ROS 生成途径中的两个关键酶 SAMDC、PAO 及与活性氧运输相关的 Ca^{2+} 转运信号通路相关基因 *calcium-transporting atsl* 的表达进行检测, 发现这 3 个基因在转基因株系中的表达量都显著高于非转基因对照植株(图 7-E~G)。在 SA 信号转导途径中除了病程相关蛋白基因 *PR1*、*PR2* 表达量显著提高外(图 7-H, I), 效应基因 *Glu2*、*NPR1*、*EDS1* (图 7-J~L), SA 合成相关基因 *ICS1* 和 *PAL* 等的表达都无显著差异(图 7-M, N); 转基因植株与非转基因植株的木质素合成基因 *CCOMT* 表达水平无显著差异(图 7-O)。由此初步推测 *TaJRL53* 提高小麦赤霉病抗性与 JA 和 ROS 信号途径以及病程相关蛋白有关。

图 6 T_1 代转 *TaJRL53* 基因植株的抗病表现

Fig. 6 FHB resistance of *TaJRL53* overexpression transgenic plants

A: 接种赤霉菌的叶片; B: 病斑面积; C: 接种赤霉菌的穗部; D: 病小穗数; E: 病轴长。1~5: 以 Bobwhite 为受体的转基因植株; 7: 以 Ph691 为受体的转基因植株。图 B、D 和 E 中括号里的数值表示统计的样本数。*、**和***分别表示在 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 水平差异显著。

A: inoculated leaf; B: lesion area; C: inoculated spike; D: number of diseases spikelets; E: length of diseased rachis. 1~5: transgenic plants from Bobwhite; 6: transgenic plant from Ph691. The numbers in brackets of B, D, and E show the number of samples. *, **, and ***: significant difference at $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$ (Student's *t*-test).

3 讨论

尽管目前发现的 JRL 凝集素存在于植物的多种组织,但对于某一个特定的 JRL 凝集素而言,其在植物体内的表达往往仅限于某一个或少数几个组织,具有一定的组织特异性。Song 等^[6]和 Jiang 等^[7]对 JRL 基因在不同组织中的表达谱进行统计分析后发现,21.4%的 JRL 基因都具有组织表达特异性。例如 *Lem2* 在内外稃及胚芽中表达^[40], *MRL-1* 和 *MRL-2* 都在根中表达^[41], *TaJAL1* 在叶鞘中表达^[31]。本研究对 *TaJRL53* 的组织特异性表达进行分析,发现 *TaJRL53* 苗期主要在茎和叶片中表达,开花期在茎、叶、穗部都有表达,但主要在穗部表达。

根据糖基结合的特异性可以将 JRLs 划分为两类:一类是半乳糖特异的 jacalin 凝集素(galactose-

specific jacalin-related lectins, gJRLs), 另一类是甘露糖或葡萄糖特异的 jacalin 凝集素(mannose-specific jacalin-related lectins, mJRLs)。现阶段所鉴定的 JRLs 大多数属于 mJRLs, 少数属于 gJRLs。对水稻、拟南芥和小麦中的 mJRLs 亚细胞定位结果显示大多数位于核/质间^[39-41]。本研究通过洋葱表皮细胞亚细胞定位,发现 *TaJRL53* 蛋白分布在细胞核/质中,表明 *TaJRL53* 具有 mJRLs 亚家族成员典型的蛋白定位特征,初步推测 *TaJRL53* 属于 mJRLs 亚家族成员。特异糖基结合试验有助于进一步确定该凝集素本身的性质。

Dirigent 蛋白通常被认为在木质素和木脂素的生物合成中起重要作用,与 Dirigent 结构域嵌合的 JRLs 基因在植物的应激反应和发育中扮演着重要角色^[12], 例如 *TaJAL1*, 及其在水稻和大麦中的同源基

图 7 抗病信号途径中标志基因的表达

Fig. 7 Expression of marker genes in resistance signaling pathways

A~C: JA 信号途径的标志基因; D, H, I: 病程相关基因; E, F: ROS 合成途径相关基因; G: 活性氧运输相关基因; J~L: SA 信号途径相关基因; M, N: SA 合成相关基因; O: 木质素合成基因; Bob: Bobwhite; 1~4: Bobwhite 为受体的转基因植株; *和**分别表示在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平差异显著。

A~C: marker genes in JA signal pathway; D, H, I: pathogenesis-related genes; E, F: ROS biosynthesis-related genes; G: ROS transport-related genes; J~L: SA signal pathway-related genes; M, N: SA biosynthesis-related genes; O: lignin biosynthesis genes; Bob: Bobwhite; 1~4: transgenic plants from Bobwhite; * and **: significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ (Student's *t*-test).

因 *OsJAC1*、*HvJAC1* 均具有广谱抗性^[31,45]。*TaJRL53* 的蛋白编码结构与 *TaJA1* 相似, 都具有 N 端的 Dirigent 结构域和 C 端的 Jacalin 结构域^[6]。本研究对 *TaJRL53* 的功能进行探究, 认为该基因参与对赤霉菌的防御过程, 对赤霉菌的侵染具有抗性。本研究首先采用 BSMV 的方法降低 *TaJRL53* 在中抗赤霉病品种 SSD006 中的表达, 发现植株对赤霉病的抗性降低。然后采用基因枪介导的遗传转化技术, 将 *TaJRL53* 过量表达载体转入感赤霉病品种 Bobwhite 和 PH691 中, 分别获得 6 株和 1 株 *TaJRL53* 的过量表达植株。对 T_1 代转基因植株采用离体叶片法和穗部单花滴注法接种赤霉菌鉴定转基因株系对赤霉菌的抗性, 离体叶片法接菌结果显示: 以 Bobwhite 为受体的转基因株系其叶片上的荧光与对照相比明显减弱, 菌斑面积显著减小。阴性对照 PH691 和以其为受体的转基因植株在接菌之后菌丝均沿接种点向四周扩散, 但转基因植株菌丝扩散程度与对照相比较轻。单花滴注法接种 T_1 代小穗后, 结果显示转基因株系与对照均出现赤霉病的典型症状, 但转基因株系与受体亲本相比病害较轻。对 T_2 代转基因株系的穗部接菌进行抗性鉴定, 各转基因株系与 T_1 代的抗病趋势一致, 表明 *TaJRL53* 的转基因株系可以减轻由禾谷镰刀菌引起的病害。同时, 本研究发现两个不同背景的转基因株系抗病性存在差异, 这可能是因为两个受体材料对赤霉病的抗性和自身的组培性能存在差异, 转基因植株中 *TaJRL53* 的拷贝数不同造成的。

SA 和 JA 介导的信号传导途径是植物在应对病原菌侵染时被激活的防卫途径, JA 在死体寄生和兼性寄生型病原菌侵染过程中起重要作用, SA 在活体寄生型病原菌的侵染过程中起重要作用, SA 和 JA 途径均参与兼性寄生型真菌赤霉菌的侵染反应^[46-47]。*TaJRL1* 是 mJRLs 亚家族中的一员, 该基因通过参与 SA 和 JA 的植物防御信号机制的组成部分, 实现小麦植株对死体寄生的灰霉菌, 活体寄生的白粉菌以及兼性寄生的赤霉菌的抗性^[28]。本研究对接种赤霉菌后的 *TaJRL53* 转基因植株的 SA 和 JA 信号转导途径相关基因的表达进行检测, 发现 JA 信号转导途径主要标志基因的表达量与对照相比有所提高, 但 SA 信号转导途径相关基因的表达并无明显变化。ROS 的产生是植物最早期的防御反应途径, ROS 的积累一方面可诱导防御基因的表达, 另一方面通过胼胝质沉积增加植物细胞壁的厚度^[48]。在 *TaJRL53* 过量表达的转基因植株中 ROS 生成途径的关键基因

SAMDC 和 *PAO* 的表达上调, 但是细胞壁合成相关的酶基因 *CCOMT* 并无表达变化, 说明 *TaJRL53* 过量表达只是改变了植株体内 ROS 的产生水平, 并不影响细胞壁的合成。

综上所述, *TaJRL53* 可能通过调控植物体内活性氧产生、JA 信号途径、诱导病程相关蛋白基因的表达水平, 从而提高植株对赤霉菌的抗性。但该基因的赤霉病抗病机制还不清楚, 其发挥作用的结构域是 Dirigent 还是 Jacalin 或是共同作用还不得而知, 碳水化合物结合蛋白作为 mJRLs 细胞活动中的关键物质, 其结合特异性在植物防御机制中的作用今后还有待阐明。

4 结论

通过 VIGS 技术和基因枪介导的遗传转化技术证明 *TaJRL53* 与赤霉病的抗性呈正相关, 赤霉菌侵染转基因株系后, ROS 和 JA 信号途径相关基因表现出上调趋势, 说明 *TaJRL53* 可能是通过参与 ROS 合成途径和 JA 信号转导途径来提高转基因植株对赤霉病的抗性。

References

- [1] Chisholm S T, Coaker G, Day B, Staskawicz B J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 2006, 124: 803–814.
- [2] Jones J D, Dangl J L. The plant immune system. *Nature*, 2006, 444: 323–329.
- [3] 李圣军. 世界小麦产量格局及演变分析. 粮食问题研究, 2017, (6): 9–15.
- [4] Li S J. Analysis of world wheat production, marketing pattern and evolution. *Grain Issues Res*, 2017, (6): 9–15 (in Chinese).
- [5] Gilbert J, Tekauz A. Review: recent developments in research on fusarium head blight of wheat in Canada. *Can J Plant Pathol*, 2000, 22: 1–8.
- [6] Goswami R S, Kistler H C. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol Plant Pathol*, 2010, 5: 515–525.
- [7] Song M, Xu W Q, Xiang Y, Jia H Y, Zhang L X, Ma Z Q. Association of jacalin-related lectins with wheat responses to stresses revealed by transcriptional profiling. *Plant Mol Biol*, 2014, 84: 95–110.
- [8] Jiang S Y, Ma Z. Ramachandran S. Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. *BMC Evol Biol*, 2010, 10: 79.
- [9] Van Damme E J M, Lannoo N, Peumans W J. Plant lectins. *Adv Bot Res*, 2008, 48: 107–209.
- [10] 徐文琦. 小麦 JRL 凝集素基因的表达及 *TaJRL2.1* 的功能分析. 南京农业大学博士学位论文, 江苏南京, 2014.
- [11] Xu W Q. Expression and Function Analysis of *TaJRL2.1* in Wheat. PhD Dissertation of Nanjing Agricultural University,

- Nanjing, Jiangsu, China, 2014 (in Chinese with English abstract).
- [10] Azarkan M, Feller G, Vandenameele J, Herman R, El Mahyaoui R, auvage E, Vanden Broeck A, Matagne A, Charlier P, Kerff F. Biochemical and structural characterization of a mannose binding jacalin-related lectin with two-sugar binding sites from pineapple (*Ananas comosus*) stem. *Sci Rep*, 2018, 8: 11508.
 - [11] Raval S, Gowda S B, Singh D D, Chandra N R. A database analysis of jacalin-like lectins: sequence-structure-function relationships. *Glycobiology*, 2004, 14: 1247–1263.
 - [12] Ma Q H. Monocot chimeric jacalins: a novel sub family of plant lectins. *Crit Rev Biotechnol*, 2014, 34: 300–306.
 - [13] Esch L, Schaffrath U. An update on jacalin-like lectins and their role in plant defense. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 1592–1602.
 - [14] Ye X Y, Ng T B, Tsang P W, Wang J. Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *J Protein Chem*, 2001, 20: 367–375.
 - [15] Desclos-Theveniau M, Arnaud D, Huang T Y, Lin G J, Chen W Y, Lin Y C, Zimmerli L. The Arabidopsis lectin receptor kinase LecRK-V.5 represses stomatal immunity induced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *PLoS Pathog*, 2012, 8: e1002513.
 - [16] Singh P, Kuo Y C, Mishra S, Tsai C H, Chen C C, Chen C W, Desclos-Theveniau M, Chu P W, Schulze B, Chinchilla D, Boller T, Zimmerli L. The lectin receptor Kinase-VI.2 is required for priming and positively regulates *Arabidopsis* pattern-triggered immunity. *Plant Cell*, 2012, 24: 1256–1270.
 - [17] Yamaji Y, Maejima K, Komatsu K, Shiraishi T, Okano Y, Himeno M, Sugawara K, Neriya Y, Minato N, Miura C, Hashimoto M, Namba S. Lectin-mediated resistance impairs plant virus infection at the cellular level. *Plant Cell*, 2012, 24: 778–793.
 - [18] Sugawara K, Shiraishi T, Yoshida T, Fujita N, Netsu O, Yamaji Y, Namba S. A replicase of Potato Virus X acts as the resistance-breaking determinant for JAX1-mediated resistance. *Mol Plant Microbe*, 2013, 26: 1106–1129.
 - [19] Hwang I S, Hwang B K. The pepper mannose-binding lectin gene CaMBL1 is required to regulate cell death and defense responses to microbial pathogens. *Plant Physiol*, 2011, 155: 447–463.
 - [20] Miya A, Albert P, Shinya T, Desak Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 19613–19618.
 - [21] Wan J, Zhang X C, Neece D, Ramonell K M, Clough S, Kim S Y, Stacey M G, Stacey G. A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2008, 20: 471–481.
 - [22] Chisholm S T, Mahajan S K, Whitham S A, Yamamoto M L, Carrington J C. Cloning of the Arabidopsis RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 97: 489–494.
 - [23] Chisholm S T, Parra M A, Anderberg R J, Carrington J C. Arabidopsis RTM1 and RTM2 genes function in phloem to restrict long-distance movement of tobacco etch virus. *Plant Physiol*, 2001, 127: 1667–1675.
 - [24] Cosson P, Sofer L, Schurdi-Levraud V, Revers F. A member of a new plant gene family encoding a Meprin and TRAF homology (MATH) domain-containing protein is involved in restriction of long distance movement of plant viruses. *Plant Signal Behav*, 2010, 5: 1321–1323.
 - [25] Nagano A J, Fukao Y, Fujiwara M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. Antagonistic jacalin-related lectins regulate the size of ER body-type β -glucosidase complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49: 969–980.
 - [26] Weidenbach D, Esch L, Möller C, Hensel G, Kümlehn J, Höfle C, Hü ckelhoven R, Schaffrath U. Polarized defense against fungal pathogens is mediated by the jacalin-related lectin domain of modular Poaceae-specific proteins. *Mol Plant*, 2016, 9: 514–527.
 - [27] Han Y, Song L, Peng C L, Liu X, Liu L H, Zhang Y H, Wang W Z, Zhou J, Wang S H, Ebbole D, Wang Z H, Lu G D. A *Magnaporthe* chitinase interacts with a rice jacalin-related lectin to promote host colonization. *Plant Physiol*, 2019, 179: 1416–1430.
 - [28] Xiang Y, Song M, Wei Z Y, Tong J H, Zhang L X, Xiao L T, Ma Z Q, Wang Y. A jacalin-related lectin-like gene in wheat is a component of the plant defence system. *J Exp Bot*, 2011, 62: 5471–5483.
 - [29] Goriach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, Hengy G, Beckhove U, Kogel K H, Oostendorp M, Staub T, Ward E, Kessmann H, Ryals J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell*, 1996, 8: 629–643.
 - [30] Subramanyam S, Smith D F, Clemens J C, Webb M A, Sardesai N, Williams C E. Functional characterization of *HFR1*, a high-mannose N-glycan-specific wheat lectin induced by Hessian fly larvae. *Plant Physiol*, 2008, 147: 1412–1426.
 - [31] Ma Q H, Tian B, Li Y L. Overexpression of a wheat jasmonate-regulated lectin increases pathogen resistance. *Biochimie*, 2010, 92: 187–193.
 - [32] Krattinger S G, Keller B. Molecular genetics and evolution of disease resistance in cereals. *New Phytol*, 2016, 212: 320–332.
 - [33] Han Y J, Zhong Z H, Song L L, Olsson Stefan, Wang Z H, Lu G D. Evolutionary analysis of plant jacalin-related lectins (JRLs) family and expression of rice JRLs in response to *Magnaporthe oryzae*. *J Integr Agric*, 2018, 17: 60345–60347.
 - [34] 宋敏. 小麦 JRL 和 DIR 基因家族的鉴定和分析. 南京农业大学博士学位论文, 江苏南京, 2013.
Song M. Identification and Analysis of JRL and DIR Gene Family. PhD Dissertation of Nanjing Agricultural University, Jiangsu, Nanjing, China, 2013.
 - [35] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*, 2001, 25: 402–408.
 - [36] Ding L N, Xu H B, Yi H Y, Yang L M, Kong Z X, Zhang L X, Xue S L, Jia H Y, Ma Z Q. Resistance to hemi-biotrophic *F. graminearum* infection is associated with coordinated and ordered expression of diverse defense signaling pathways. *PLoS One*, 2011, 6: e19008.
 - [37] Vasil I K, Vasil V. Transformation of wheat via particle bombardment. *Meth Mol Biol*, 2006, 318: 273–283.
 - [38] Ma Z Q, Sorrells M E. Genetic analysis of fertility restoration in wheat using restriction fragment length polymorphisms. *Crop Sci*, 1995, 3: 1137–1143.
 - [39] Li G Q, Zhou J Y, Jia H Y, Gao Z X, Fan M, Luo Y J, Zhao P T,

- Xue S L, Li N, Yuan Y, Ma S W, Kong Z X, Jia L, An X, Jiang G, Liu W X, Cao W J, Zhang R R, Fan J C, Xu X W, Liu Y F, Kong Q Q, Zheng S H, Wang Y, Qin B, Cao S Y, Ding Y X, Shi J X, Yan H S, Wang X, Ran C F, Ma Z Q. Mutation of a histidine-rich calcium-binding-protein gene in wheat confers resistance to Fusarium head blight. *Nat Genet*, 2019, 51: 1106–1112.
- [40] Abebe T, Skadsen R W, Kaeppler H F. A proximal upstream sequence controls tissue-specific expression of *Lem2*, a salicylate-inducible barley lectin-like gene. *Planta*, 2005, 21: 170–183.
- [41] Jia F, Rock C D. Jacalin lectin *At5g28520* is regulated by ABA and *miR846*. *Plant Signal Behav*, 2013, 8: e24563.
- [42] Xing L J, Li J, Xu Y Y, Xu Z H, Chong K. Phosphorylation modification of wheat lectin *VER2* is associated with vernalization-induced O-GlcNAc signaling and intracellular modality. *PLoS One*, 2009, 4: e4854.
- [43] He X, Li L, Xu H, Xi J, Cao X, Xu H, Rong S, Dong Y, Wang C, Chen R, Xu J, Gao X, Xu Z. A rice jacalin-related mannose-binding lectin gene, *OsJRL*, enhances *Escherichia coli* viability under high salinity stress and improves salinity tolerance of rice. *Plant Biol* (Stuttg), 2017, 19: 257–267.
- [44] Zhang H L, Deng C, Yao J, Zhang Y L, Zhang Y N, Deng S R, Zhao N, Sa G, Zhou X Y, Lu C F, Lin S Z, Zhao R, Chen S L. *Populus euphratica* JRL mediates ABA response, ionic and ROS homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 815.
- [45] Weidenbach D, Esch L, Möller C, Hensel G, Kumlehn J, Höfle C, Hükelhoven R, Schaffrath U. Polarized defense against fungal pathogens is mediated by the jacalin-related lectin domain of modular Poaceae-specific proteins. *Mol Plant*, 2016, 9: 514–527.
- [46] Beckers G J M, Spoel S H. Fine-tuning plant defense signaling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biol*, 2006, 8: 1–10.
- [47] Glazebrook J, Chen W, Estes B, Chang H S, Nawrath C, Metraux J P, Zhu T, Katagiri F. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J*, 2003, 34: 217–228.
- [48] Khaledi N, Taheri P, Falahati-Rastegar M. Reactive oxygen species and antioxidant system responses in wheat cultivars during interaction with *Fusarium* species. *Australas Plant Pathol*, 2016, 45: 653–670.