

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2026.53032

玉米禾谷镰孢穗腐病抗性候选基因的筛选与鉴定

董丽华 董成艳 李正楠 余 静 叶 靛 刘 芳 谭 静*

云南大学农学院, 云南昆明 650500

摘 要: 禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*, *Fg*)穗腐病是造成我国西南地区玉米减产的主要因素之一。本研究选取对禾谷镰孢穗腐病表现高抗和高感的玉米自交系各 2 个(高抗系 4019 和 NMJT, 高感系黄早四和 GEMS61), 对授粉后 15 d 的籽粒接种禾谷镰孢, 设置 3 个侵染时间点进行取样和转录组测序, 通过差异表达基因(differentially expressed genes, DEG)分析并结合前期全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)共定位、qRT-PCR 验证、克隆及其序列比对和表达模式研究, 对玉米抗禾谷镰孢穗腐病候选基因进行筛选、克隆和初步验证。主要研究结果如下: (1) 转录组分析结果表明, 禾谷镰孢侵染 3 个时间点抗感材料之间均存在大量的 DEG; 2 个抗病材料间存在共同的响应机制, DEG 主要富集于植物次生代谢产物、植物激素信号转导、钙信号通路和抗氧化系统等通路; 同时, 2 个抗病材料间也存在特异的响应机制, 通过调控各自特异的基因表达增强其抗病性。(2) 结合转录组 DEG 与 GWAS 共定位到 24 个基因, 根据基因功能注释和文献报道, 从中预测了 12 个可能与禾谷镰孢穗腐病抗性相关的候选基因; 经 qRT-PCR 验证并进行克隆, 成功克隆出 2 个基因 *Zm00001eb104020* 和 *Zm00001eb195780*。(3) 对 2 个候选基因进行序列比对和时空表达模式分析表明, 2 个基因编码的蛋白序列在抗感材料间存在共同的位点突变和缺失; 2 个候选基因的时空表达特征存在明显差异, 但其表达量在抗病材料中均较感病材料高, 且均表现为接种禾谷镰孢后在籽粒中被诱导显著上调。研究结果为后续玉米抗禾谷镰孢穗腐病候选基因的分子机制解析、功能验证及抗病种质的选育提供了理论依据。

关键词: 玉米; 禾谷镰孢穗腐病; 抗性候选基因; 功能位点鉴定; 时空表达特征

Screening and identification of candidate resistance genes to gibberella ear rot caused by *Fusarium graminearum* in maize

Dong Li-Hua, Dong Cheng-Yan, Li Zheng-Nan, Yu Jing, Ye Liang, Liu Fang, and Tan Jing*

School of Agriculture, Yunnan University, Kunming 650500, Yunnan, China

Abstract: Gibberella ear rot (GER) of maize (*Zea mays* L.), caused by *Fusarium graminearum* (*Fg*), is a major factor contributing to yield losses in southwestern China. In this study, two highly resistant inbred lines (4019 and NMJT) and two highly susceptible lines (Huangzaosi and GEMS61) were selected. Kernels at 15 days after pollination were inoculated with *Fg*, and samples were collected at three post-infection time points for transcriptome sequencing. Candidate resistance genes were identified, cloned, and preliminarily validated through a combination of differentially expressed gene (DEG) analysis, previous genome-wide association study (GWAS) results, qRT-PCR validation, cloning and sequence alignment, and expression pattern analysis. The main findings were as follows: (1) Transcriptome analysis revealed a large number of DEGs between resistant and susceptible lines at all three infection stages. The two resistant lines shared common defense responses, with DEGs significantly enriched in pathways such as plant secondary metabolism, plant hormone signal transduction, calcium signaling, and the antioxidant system. In addition, each resistant line exhibited specific defense mechanisms by regulating unique gene expression patterns. (2) Integration of DEG and GWAS data identified 24 co-localized genes. Based on gene annotation and literature reports, 12 genes were predicted as

本研究由国家自然科学基金项目(32260516)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (32260516).

* 通信作者(Corresponding author): 谭静, E-mail: tanjingli@sina.com

第一作者联系方式: E-mail: 2197666787@qq.com

Received (收稿日期): 2025-05-29; Accepted (接受日期): 2025-10-30; Published online (网络出版日期): 2025-11-05.

URL: <https://link.cnki.net/urlid/11.1809.S.20251104.1745.002>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

potential candidates for GER resistance. Among these, two genes—*Zm00001eb104020* and *Zm00001eb195780*—were successfully cloned and validated by qRT-PCR. (3) Protein sequence analysis revealed shared mutations and deletions between resistant and susceptible lines. The two candidate genes also showed distinct spatiotemporal expression patterns, with significantly higher expression levels in resistant lines. Both genes were strongly induced and upregulated in kernels following *Fg* inoculation. These results provide a theoretical foundation for further functional characterization of GER resistance mechanisms and the breeding of resistant maize germplasm.

Keywords: maize; gibberella ear rot; candidate resistance genes; functional site identification; spatio-temporal expression characteristics

玉米穗腐病是一种世界范围内普遍发生的真菌性病害, 1946 年首次在美国被报道^[1], 之后在全球玉米产区蔓延造成严重危害^[2-4]。随着我国玉米面积的不断扩大和高产密植栽培技术的推广, 该病在东北、黄淮海和西南等玉米产区普遍发生; 特别是在我国西南玉米产区, 穗腐病发生尤为严重, 为该产区主要的玉米病害之一^[5-8]。迄今已报道的引起玉米穗腐病的病原菌有 70 多种^[9-12], 其中禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)和拟轮枝镰孢(*F. verticillioides*)为我国玉米穗腐病的优势病原菌^[11,13-15], 而禾谷镰孢复合种是我国西南地区主要的优势菌株之一^[16]。研究已证实, 禾谷镰孢感染不仅会造成玉米果穗腐烂引起大幅度减产^[17-19], 该菌还产生多种真菌毒素, 包括脱氧雪腐镰孢烯醇和赤霉烯酮等, 这些真菌毒素会对人类和牲畜的健康造成极大威胁^[20-21]。因此, 研究并防治玉米禾谷镰孢穗腐病的发生和危害对我国的农业生产和粮食安全具有重要的意义。

一直以来, 人们通过自然和人工接种的方式对玉米禾谷镰孢穗腐病的抗源进行筛选, 但发现高产和抗病兼具的品种较少。杨俊伟等^[22]对国内玉米杂交种进行禾谷镰孢抗性鉴定, 结果表明仅 5.13% 品种表现高抗且年际间变化较大; 夏玉生等^[23]对 346 个玉米自交系进行抗禾谷镰孢穗腐病的种质鉴定, 发现表现高抗的材料仅占 2.9%; 段灿星等^[24]对 690 份玉米自交系进行 3 年共 6 点的人工接种抗穗腐病鉴定, 共筛选出 H446 等 17 份对禾谷镰孢穗腐病具有稳定抗性的自交系; 何玥等^[25]对 998 份玉米地方种质进行禾谷镰孢穗腐病的抗性鉴定, 结果仅有 3 份地方种质表现高抗; 陈鸽等^[26]对我国东北地区 523 个玉米自交系进行抗性鉴定发现, “吉 A1473”等 23 个自交系对禾谷镰孢穗腐病能达到中抗以上、占总参试自交系的 4.2%。以上的研究虽已鉴定出部分对禾谷镰孢穗腐病表现抗性的玉米种质, 但我国西南地区温暖湿润的气候条件和复杂多样的耕作制度, 导致该地区生产上仍缺乏稳定高抗禾谷镰孢穗腐病的玉米种质。

玉米对禾谷镰孢穗腐病的抗性受许多数量性状位点(quantitative trait locus, QTL)控制, 这些 QTL 表现加性和显性效应, 同时还受到环境气候的影响, 遗传非常复杂^[27-29]。目前已有众多关于玉米禾谷镰孢穗腐病抗性 QTL 的定位研究, 譬如 Reinprecht 等^[30]利用基因芯片技术, 定位到约 100 个与禾谷镰孢穗腐病抗性相关的候选基因; Yuan 等^[31]以 298 个玉米自交系为作图群体, 共定位出 10 个抗禾谷镰孢穗腐病的 QTL; Akohoue 等^[32]发现 11 个 QTL 能控制玉米花丝和籽粒对禾谷镰孢穗腐病的抗性, 证明存在具有多重抗性的基因组区域; 王梓钰等^[33]利用 3 个高抗和 1 个高感玉米自交系构建 3 个作图群体对禾谷镰孢穗腐病抗性 QTL 进行定位, 结果共检测到 11 个与禾谷镰孢穗腐病抗性有关的 QTL; 周帆等^[34]研究表明 *ZmBT2b* 基因在玉米抗禾谷镰孢侵染过程中具有抗性作用; 闻竞等^[35]通过对 527 个玉米自交系进行全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS), 检测到 Gyp 1p 超家族蛋白的 Ypt/rab-GAP 结构域的 4 个 SNP 与玉米禾谷镰孢穗腐病的抗性显著相关。总之, 目前已有 100 多个玉米禾谷镰孢穗腐病抗性 QTL 被报道, 但由于置信区间大、效应微弱、易受环境影响等因素, 尚未有玉米禾谷镰孢穗腐病抗性 QTL 被克隆。因此, 鉴定和克隆玉米禾谷镰孢穗腐病抗性基因并解析其作用机制还需更多研究来揭示。

基于禾谷镰孢穗腐病对我国玉米生产的重要影响, 而相关抗性基因及其抗病机制还尚未明晰, 本课题组前期利用 241 个来源广泛的玉米自交系, 通过 2 年田间接种鉴定筛选出多个高抗禾谷镰孢穗腐病的玉米自交系; 利用 20,586 个高质量 SNP 标记通过 GWAS 鉴定出 11 个与禾谷镰孢穗腐病抗性显著关联的 SNP 位点^[36]。在此基础上, 本研究选取对禾谷镰孢穗腐病表现高抗和高感的玉米自交系各 2 个, 通过室内禾谷镰孢侵染不同时间籽粒的转录组测序, 进行抗感材料差异表达基因(differential expression genes, DEG)及其富集分析; 结合转录组 DEG 与前期

GWAS 结果共定位筛选抗病候选基因, 将共定位获得的抗性候选基因进行克隆、序列比对及时空表达模式分析, 初步探索候选基因在玉米禾谷镰孢穗腐病抗性中的功能, 以期为玉米抗禾谷镰孢穗腐病基因的功能验证及其分子机制的揭示和育种应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 玉米材料 基于前期 2 年的大田人工接种鉴定结果, 选取对禾谷镰孢穗腐病表现高抗和高感的玉米自交系各 2 个, 具体信息见表 1。

1.1.2 病原菌 本研究使用的禾谷镰孢(*Fusarium*

graminearum)由云南农业大学何月秋教授实验室提供, 分离自云南省采集的穗腐病样本, 经单胞纯化培养并通过柯赫氏法则证实具有致病性。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌培养与孢子悬浮液制备 将活化后的禾谷镰孢接种到 PDA 平板上, 28℃暗培养 3~7 d; 待菌丝长满平板后, 取 3~6 个菌块接种到绿豆培养基中, 28℃、180 r min⁻¹ 震荡培养 2 周左右, 每 5~7 d 取菌液检测产孢情况。在接种前一天, 采用血细胞计数器对孢子进行计数后, 用无菌水配制成孢子悬浮液(浓度为 5×10⁶ 个 mL⁻¹), 加入 2 μL mL⁻¹ 的表面活性剂吐温-80 后混匀, 于 4℃冰箱保存备用。

表 1 禾谷镰孢穗腐病高抗和高感的玉米自交系信息
Table 1 Information on maize inbred lines with high resistance and high susceptibility to GER

抗性 Resistance	代号 No.	自交系 Inbred lines	系谱 Pedigree	来源/类群 Source/group
高抗 High resistance	R1	4019	G108×G172	中国/温带非硬秆种 China / temperate non-stiff stalk group
	R2	NMJT	地方种质 Local germplasm	中国/温热混合 China / temperate & tropical mixed group
高感 High susceptibility	S1	黄早四 Huangzaosi	黄改 Huanggai	中国/唐四平头 China / Tangsipingtou
	S2	GEMS61	ARI16026:S17-10-1-B-B	美国/热带 USA / tropical group

1.2.2 玉米材料种植与取样接种 将表 1 中的 4 个玉米自交系种植于云南省元江县(23°36'N, 101°59'E), 常规水肥管理, 开花期套袋并人工自交; 人工授粉 15 d 后每个自交系各取 1 个生长正常、籽粒饱满的果穗, 剥离每个果穗的中部籽粒, 按半粒侵染法进行处理^[37], 即将剥离后的每个籽粒沿中间切开, 一半在无菌水中浸泡(对照组 CK), 另一半在禾谷镰孢孢子悬浮液中浸泡(接菌组 Fg), 2 组均处理 5 min; 将浸泡后的籽粒分别转移到 PDA 平板上 28℃暗培养, 此时取样记为 0 hpi, 之后 1.5 h 和 6 h 分别取样记为 1.5 hpi 和 6 hpi; 每个时间点设 3 个重复, 每个重复取 8~10 个玉米半粒, 液氮速冻后于 -80℃保存备用。

1.2.3 转录组测序与差异表达基因分析 采用 Trizol 试剂盒对籽粒进行总 RNA 的提取, RNA 质量检测合格后一部分送诺禾致源进行文库构建和转录组测序, 另一部分用于后续 qRT-PCR 验证; 使用 Illumina Hiseq 2000 测序平台进行双末端测序, 将测序所得的原始数据使用 Bcl2FastQ 软件根据 Index 序列分割转换成 FastQ 文件; 使用 Trim Galore 软件去除含接头的、含 N 比例大的 reads (质量值 Q ≤ 10 的碱基数占整个 reads 的 50%以上)和重复 reads, 再

用 FastQC 对数据质量进行评估; 利用 Rfam 上的 rRNA 序列使用 Bowtie2 进行比对, 去除核糖体的 RNA 数据, 再利用 HISAT2 软件与玉米 B73 (V5 版) 基因组进行比对; 然后进行基因表达量计算与差异表达分析。

使用 DESeq 包(R 语言)对 DEGs 进行筛选, log₂ |Fold change| > 0 以及 P < 0.05 的基因被定义为 DEG; 将得到的 DEG 分别向 Gene Ontology 数据库 (<http://www.geneontology.org/>)的各个 term 映射, 同时使用 KOBAS (2.0)对 DEG 进行 Pathway 解析, P < 0.05 的 GO 条目与 KEGG 代谢途径被定义为显著性富集条目和代谢途径, 最后利用超几何检验找出与整个基因组背景相比显著富集 GO 条目与 Pathway。

1.2.4 共定位与 qRT-PCR 验证 根据前期 GWAS 结果, 在其检测到的显著关联位点上下游 100 kb 范围搜索, 结合本次转录组 DEG 比较寻找共同定位到的基因; 从以上共定位基因中随机选择 8 个表达量较高的基因进行 qRT-PCR 验证, 使用 1.2.3 预留的 RNA 进行反转录, 将反转录后 cDNA 作为模板, 采用荧光定量检测候选基因的表达量。

1.2.5 候选基因的克隆及其序列比对 从以上共定位得到的候选基因中, 根据功能注释和文献报道

进一步筛选抗病相关的候选基因;利用在线网站 Ensembl Plants (<https://plants.ensembl.org/index.html>) 下载候选基因的序列,使用软件 Primer Premier 6.0 设计克隆引物,以高抗和高感材料的 RNA 反转录第一链 cDNA 为模板进行扩增;扩增产物纯化后转化至大肠杆菌 pCE2 TA/Blunt-Zero (Vazyme),培养 12~14 h 后挑取单克隆菌液送公司测序;将测序结果用软件 Snapgene 进行序列比对,根据编码的氨基酸序列推测可能产生抗病表现的关键氨基酸位点。

1.2.6 候选基因的时空表达分析 在云南大学农学院温室种植表 1 中的 4 个玉米自交系,在苗期(四叶期)、开花期(抽丝当天)、结实初期(套袋授粉后 3 周)和结实后期(套袋授粉后 5 周),对玉米的根、茎、叶、雄穗、雌穗和籽粒的不同组织进行取样,提取 RNA 后利用 qRT-PCR 对候选基因进行表达量分析。其中授粉后 1 周采用针刺法对玉米果穗接种禾谷镰孢子悬浮液,同时接种清水作为对照,结实初期和结实后期同时取 2 个处理下的不同组织进行表达量检测。

2 结果与分析

2.1 测序数据质量及重复间的相关性分析

将 72 份样品 RNA-seq 下机所得原始数据进行预处理,共获得 3,294,736,834 条 clean reads,所有样品 clean reads 的 Q20 值为 96.22%~97.99%,Q30 值为 90.34%~94.30%,GC 含量为 55.56%~57.22%,表明转录组数据质量较高,测序结果准确可靠,可进行后续分析。

使用 HISAT2 软件分别将 72 份样品的 clean

reads 比对至玉米 B73 (V5 版)参考基因组,共有 2,829,891,182 条 clean reads 可比对到参考基因组中,Mapping Rates 为 69.18%~90.93%;各样品中 Multiple mapped Rates 为 2.27%~5.19%,Uniquely mapped Rates 为 68.50%~87.02%,说明测序样品不存在污染,数据量满足要求。

根据均一化处理后基因的表达量 FPKM,筛选出 FPKM 大于 1 的基因用于后续分析。对重复样品间的相关性进行分析,结果显示基因在任一样品的 3 个生物学重复间的表达高度相关($R^2 > 0.8$),表明测序数据有较好的重复性。

2.2 差异基因的筛选与分析

2.2.1 高抗材料与高感材料间的差异基因筛选

对高抗材料 R1 与高感材料 S1、S2 在同一处理下 3 个取样时间点的 DEG 进行分析,共获得 6 组差异表达基因集(表 2);对同一处理下高抗材料 R2 与高感材料 S1、S2 间在 3 个取样时间点的差异表达基因进行分析,可得到 6 组差异表达基因集(表 3)。由此可见,在禾谷镰孢侵染的 3 个时间点 2 个抗病材料与感病材料间均存在大量的 DEG。

分别取表 2 中 R1 vs S1 和 R1 vs S2 在 Fg-CK 处理下 DEGs 的合集、表 3 中 R2 vs S1 和 R2 vs S2 在 Fg-CK 处理下 DEG 的合集,再取以上 2 个合集的交集得到 2 个抗病材料在接菌处理下较感病材料差异表达的共有基因,它们在 0 hpi、1.5 hpi 和 6 hpi 上调表达的分别有 654、809 和 427 个,其中有 13 个基因在 3 个时间点均上调表达;下调表达的分别有 795、1004 和 743 个,其中有 9 个基因在 3 个时间点均下调表达(图 1)。

表 2 高抗材料 R1 与高感材料 S1、S2 在同一处理 3 个取样时间点的 DEG

Table 2 DEGs between highly resistant inbred R1 and highly susceptible inbreds S1 and S2 under the same treatment at three sampling time points

组合 Paired samples	处理 Treatment	0 hpi		1.5 hpi		6 hpi	
		上调 Up	下调 Down	上调 Up	下调 Down	上调 Up	下调 Down
R1 vs S1	CK	7461	7959	6487	6514	7105	7111
	Fg	6593	6624	6896	6709	7161	6789
	Fg-CK	1875	1554	2305	2323	2382	2328
R1 vs S2	CK	7047	7552	5918	6826	5451	5752
	Fg	5110	5872	4727	5162	6380	6375
	Fg-CK	1956	1731	1724	1464	2525	2195

R1: 高抗材料 4019; S1: 高感材料黄早四; S2: 高感材料 GEMS61。CK: 无菌水处理; Fg: 接菌处理; Fg-CK: 剔除无菌水处理下材料间背景差异的基因。0 hpi、1.5 hpi 和 6 hpi 分别表示籽粒在 PDA 平板上培养 0 h、1.5 h 和 6 h。

R1: highly resistant material 4019; S1: highly susceptible material Huangzaosi; S2: highly susceptible material GEMS61. CK: sterile water treatment; Fg: inoculation treatment; Fg-CK: genes with background differences between materials under sterile water treatment were removed. 0 hpi, 1.5 hpi and 6 hpi indicated the grains cultured on PDA plate for 0 h, 1.5 h and 6 h, respectively.

表 3 高抗材料 R2 与高感材料 S1、S2 在同一处理 3 个取样时间点的 DEG
Table 3 DEGs between highly resistant inbred R2 and highly susceptible inbreds S1 and S2 under the same treatment at three sampling time points

组合 Paired samples	处理 Treatment	0 hpi		1.5 hpi		6 hpi	
		上调 Up	下调 Down	上调 Up	下调 Down	上调 Up	下调 Down
R2 vs S1	CK	7683	7630	5677	5207	7497	7672
	Fg	5660	5824	6460	6001	4037	4074
	Fg-CK	1175	939	2476	2335	1051	1176
R2 vs S2	CK	7634	7869	5782	6321	5933	6361
	Fg	5529	6193	6221	5911	4903	5458
	Fg-CK	1687	1517	2575	1695	1753	1654

R2: 高抗材料 NMJT; S1: 高感材料黄早四; S2: 高感材料 GEMS61. CK: 无菌水处理; Fg: 接菌处理; Fg-CK: 剔除无菌水处理下材料间背景差异的基因。0 hpi、1.5 hpi 和 6 hpi 分别表示籽粒在 PDA 平板上培养 0 h、1.5 h 和 6 h。
R2: highly resistant material NMJT; S1: highly susceptible material Huangzaosi; S2: highly susceptible material GEMS61. CK: sterile water treatment; Fg: inoculation treatment; Fg-CK: genes with background differences between materials under sterile water treatment were removed. 0 hpi, 1.5 hpi and 6 hpi indicated the grains cultured on PDA plate for 0 h, 1.5 h and 6 h, respectively.

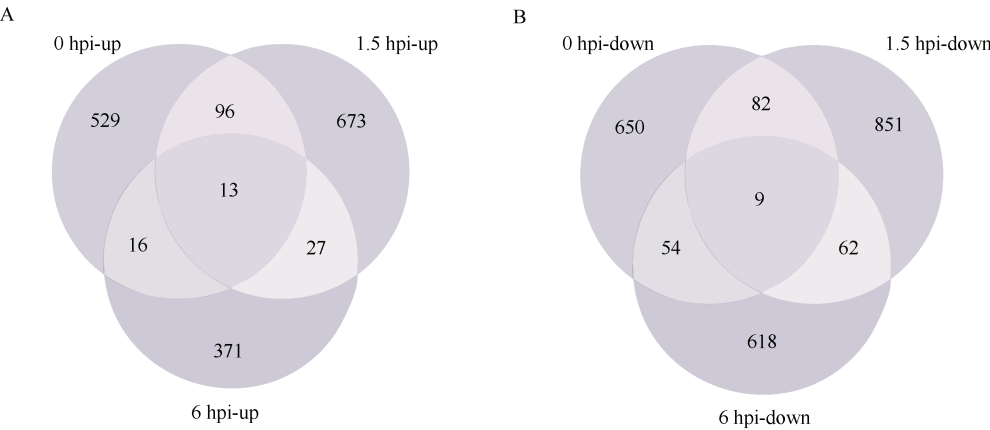


图 1 接菌处理下 2 个抗病材料较感病材料差异表达的共有基因在 3 个时间点的韦恩图
Fig. 1 Venn diagrams of common DEGs between R1 vs S1 & S2 and R2 vs S1 & S2 at three sampling time points
A: 上调 DEG 的韦恩图; B: 下调 DEG 的韦恩图。0 hpi、1.5 hpi 和 6 hpi 分别表示籽粒在 PDA 平板上培养 0 h、1.5 h 和 6 h。
A: Venn diagrams of Up DEGs; B: Venn diagrams of Down DEGs. 0 hpi, 1.5 hpi, and 6 hpi indicated the grains cultured on PDA plate for 0 h, 1.5 h and 6 h, respectively.

2.2.2 高抗材料与高感材料间的差异基因功能分析
对 2 个抗病材料在接菌处理下较感病材料差异表达的共有基因进行 GO 富集分析发现, 上调表达的 DEG 在 0 hpi 所富集到的 GO 条目有 418 个, 其中显著富集于 36 个条目, 包括应激响应、各类酶的活性和铁离子结合等; 在 1.5 hpi 所富集到的 GO 条目有 471 个, 其中显著富集于 19 个条目, 包括酸类物质生物合成、应激响应和小分子生物合成过程等; 在 6 hpi 所富集到的 GO 条目有 418 个, 其中显著富集于 13 个条目, 包括药物跨膜转运、对化学物质响应和染色体组织等(图 2-A)。下调表达的 DEG 在 0 hpi 所富集到的 GO 条目有 561 个, 其中显著富集于 29 个条目, 包括脂类物质代谢、染色体组织和氧化还原酶活性等; 在 1.5 hpi 所富集到的 GO 条目有 548

个, 其中显著富集于 47 个条目, 包括核苷酸代谢过程和各类酶活性等; 在 6 hpi 所富集到的 GO 条目有 467 个, 其中显著富集于 50 个条目, 包括各类物质分解代谢、细胞外周、水解酶活性和序列特异性 DNA 结合等(图 2-B)。
KEGG 富集分析显示, 上调表达的 DEG 在 0 hpi 共富集到 64 条通路, 其中有 3 条通路为显著富集, 包括植物激素信号转导、苯丙素类生物合成和多种植物次生代谢产物合成; 在 1.5 hpi 共富集到 67 条通路, 其中有 8 条通路为显著富集, 包括植物激素信号转导、类胡萝卜素和苯丙烷类的生物合成; 在 6 hpi 共富集到 58 条通路, 其中有 3 条通路为显著富集, 包括植物激素信号转导、萜类化合物合成和类胡萝卜素生物合成(图 2-C)。下调表达的 DEG 在

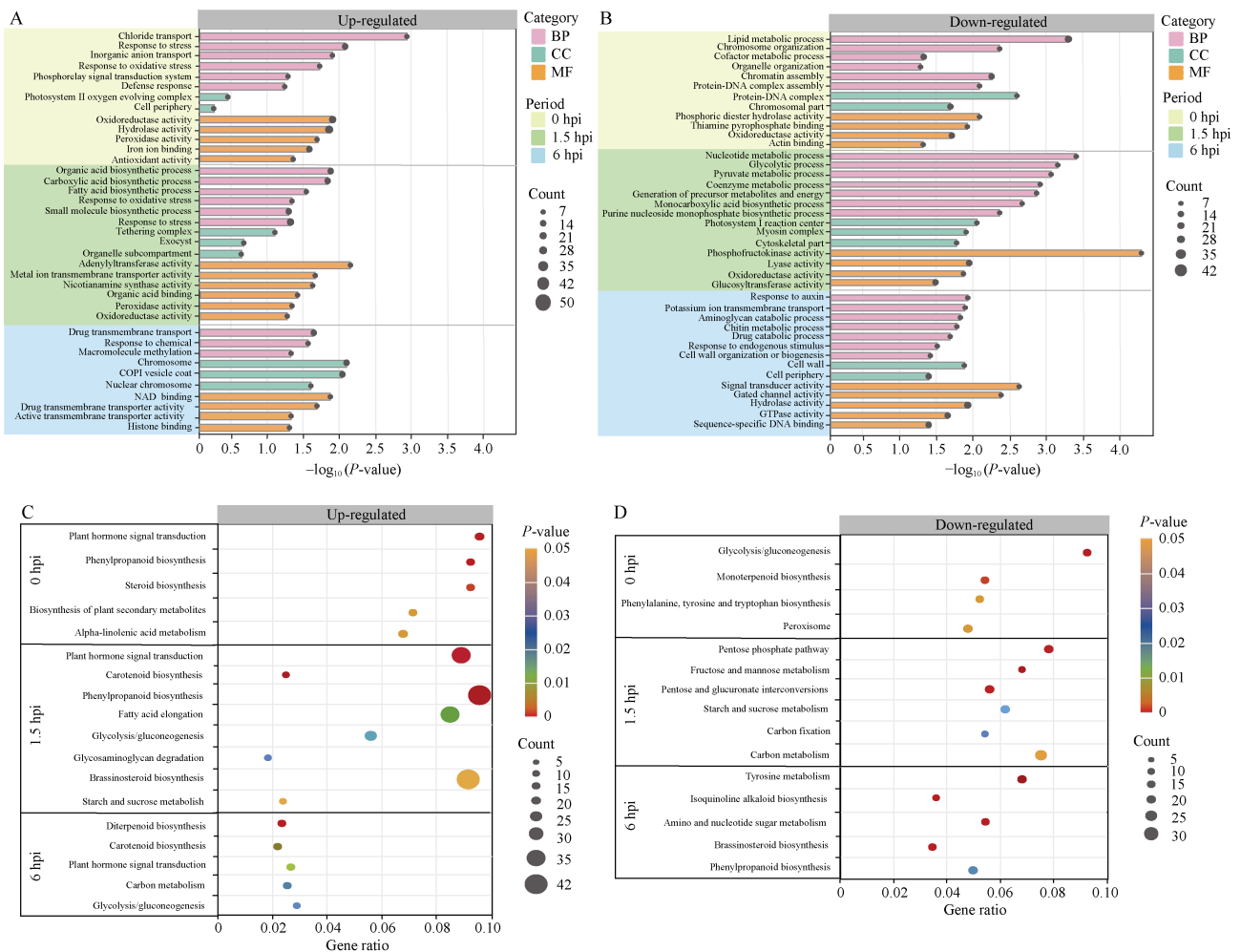


图 2 接菌处理下 2 个抗病材料较感病材料差异表达共有基因在 3 个时间点的 GO 和 KEGG 富集分析

Fig. 2 GO and KEGG enrichment analysis of common DEGs between R1 vs S1 & S2 and R2 vs S1 & S2 at three sampling time points
A: 上调 DEG 的 GO 分析; B: 下调 DEG 的 GO 分析; C: 上调 DEG 的 KEGG 分析; D: 下调 DEG 的 KEGG 分析。0 hpi、1.5 hpi、6 hpi 分别表示籽粒在 PDA 平板上培养 0 h、1.5 h、6 h。BP: 生物过程; CC: 细胞组分; MF: 分子功能。
A: GO analysis of up-regulated DEGs; B: GO analysis of down-regulated DEGs; C: KEGG analysis of up-regulated DEGs; D: KEGG analysis of down-regulated DEGs. 0 hpi, 1.5 hpi and 6 hpi indicated the grains cultured on PDA plate for 0 h, 1.5 h and 6 h, respectively. BP: biological process; CC: cellular component; MF: molecular function.

0 hpi 共富集到 81 条通路, 只有苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成这 1 条通路为显著富集; 在 1.5 hpi 共富集到 90 条通路, 其中有 4 条通路为显著富集, 包括糖类物质合成和代谢、碳代谢等; 在 6 hpi 共富集到 64 条通路, 其中有 5 条通路为显著富集, 包括糖类物质合成和代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢等(图 2-D)。

2.3 联合 GWAS 与 RNA-seq 共定位和候选基因 qRT-PCR 验证

结合玉米 B73 (V5 版)基因组, 在前期 GWAS 检测到与禾谷镰孢穗腐病抗性显著关联的 11 个 SNP 位点上下游 100 kb 范围内搜索, 共筛选出 45 个相关基因^[36]; 将这些基因与 RNA-seq 检测到接菌处理下

R1 较 S1 和 S2 以及 R2 较 S1 和 S2 去除背景差异后的所有 DEG 进行比较, 结果发现其中有 24 个基因被 GWAS 和 RNA-seq 同时检测到(表 4)。

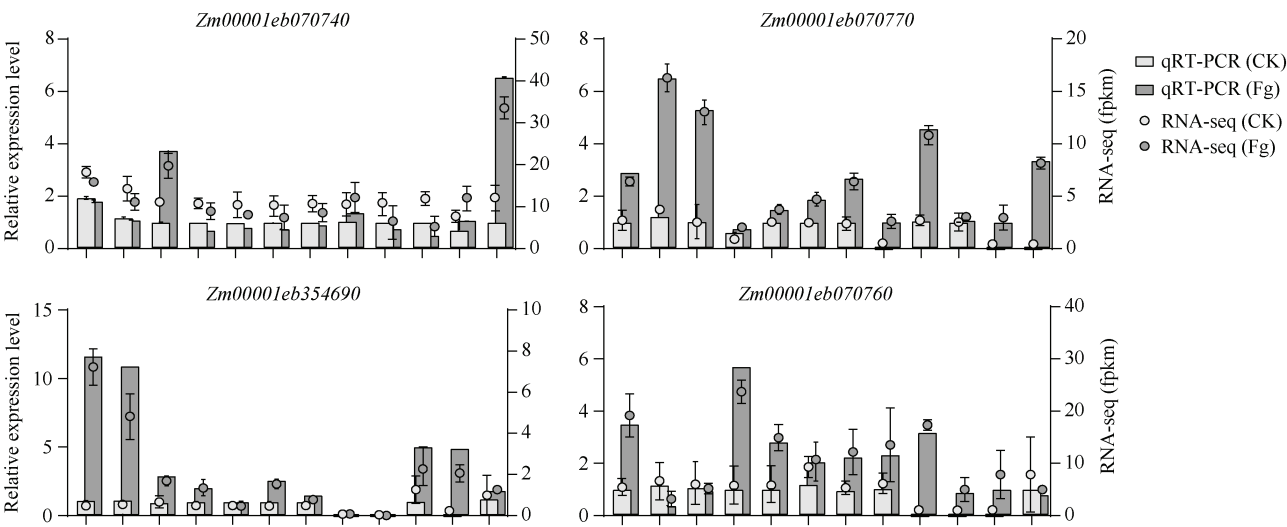
从以上共定位 24 个候选基因中随机选择 8 个转录组中基因表达量(FPKM)较高的差异基因进行 qRT-PCR 验证。结果表明, 这 8 个基因在 2 个高抗和 2 个高感材料 3 个时间点中的表达趋势与转录组数据高度一致(图 3), 表明转录组结果可靠。

2.4 候选基因克隆及其序列比对

对以上共定位 24 个候选基因通过基因功能注释及相关文献^[38-53]分析, 进一步筛选出以下 12 个基因 *Zm00001eb070740*、*Zm00001eb070770*、*Zm00001eb354690*、*Zm00001eb070760*、*Zm00001eb070700*、

表 4 转录组差异基因与前期 GWAS 共定位结果
Table 4 Co-localization of transcriptome DEGs with previous GWAS results

基因 Gene	描述 Description
Zm00001eb240340	含 ABC 转运蛋白结构域的蛋白质 ABC transporter domain-containing protein
Zm00001eb309360	MYB-CC 型转录因子 LHEQLE 含结构域蛋白 MYB-CC type transcription factor LHEQLE-containing domain-containing protein
Zm00001eb309010	磷酸甘油酸变位酶家族蛋白 Phosphoglycerate mutase family protein
Zm00001eb070740	四肽重复序列(TPR)样超家族蛋白 Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
Zm00001eb070690	DNA 聚合酶 DNA polymerase eta
Zm00001eb070770	光系统 I 的积累 Accumulation of photosystem I
Zm00001eb354690	植物血红素过氧化物酶家族结构域内含蛋白 Plant heme peroxidase family profile domain-containing protein
Zm00001eb070760	蛋白质阿戈核酸酶 2 Protein argonaute 2
Zm00001eb248650	细胞周期蛋白-T1-3 Cyclin-T1-3
Zm00001eb195760	抗病蛋白 RPM1 Disease resistance protein RPM1
Zm00001eb197630	谷氨酰 tRNA (Gln)酰胺转移酶亚基 B 叶绿体/线粒体 Glutamyl-tRNA (Gln) amidotransferase subunit B chloroplastic / mitochondrial
Zm00001eb070720	富含亮氨酸的重复跨膜蛋白激酶 Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase
Zm00001eb239920	蛋白质丝氨酸/苏氨酸磷酸酶 Protein-serine/threonine phosphatase
Zm00001eb195720	未鉴定蛋白 Uncharacterized protein
Zm00001eb195790	TRAF 样超家族蛋白 TRAF-like superfamily protein
Zm00001eb195710	假定的无酶家族蛋白 Putative apyrase family protein
Zm00001eb104020	磷脂酶 D Phospholipase D
Zm00001eb070750	OSJNBa0008M17.14 样蛋白 OSJNBa0008M17.14-like protein
Zm00001eb195780	V 型质子 ATP 酶亚单位 S1/VOA1 跨膜结构域含蛋白 V-type proton ATPase subunit S1/VOA1 transmembrane domain-containing protein
Zm00001eb106040	聚腺苷酸结合蛋白 RBP45C Polyadenylate-binding protein RBP45C
Zm00001eb070700	LRR 受体样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase
Zm00001eb248680	含 NAC 结构域蛋白质 NAC domain-containing protein
Zm00001eb070730	富含亮氨酸的重复跨膜蛋白激酶 Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase
Zm00001eb354680	过氧化物酶 Peroxidase



(图 3)

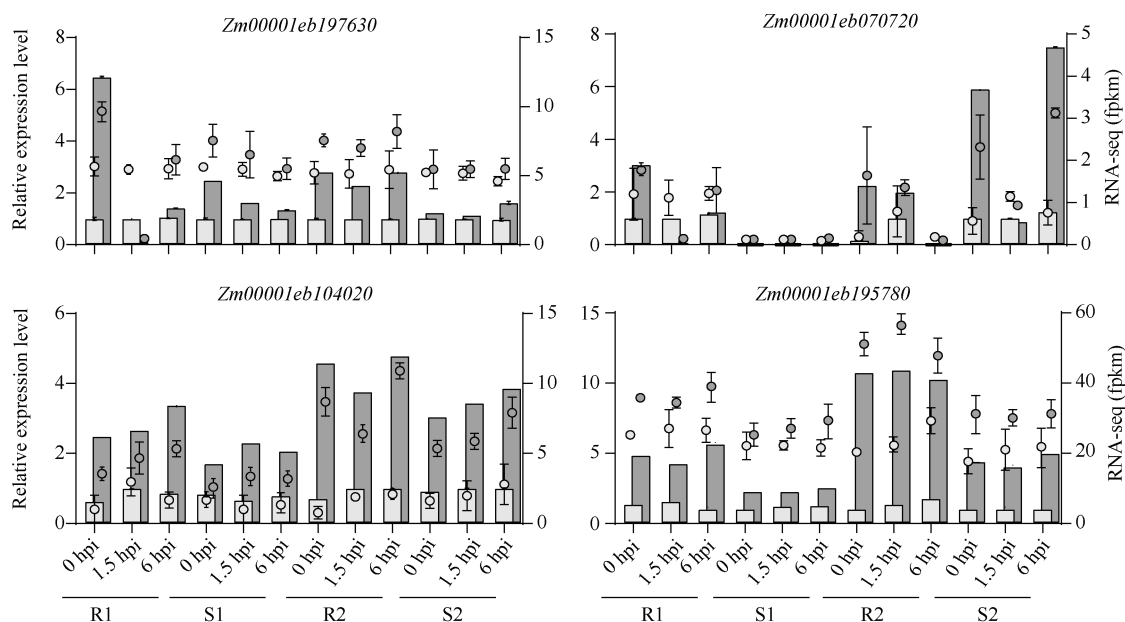


图 3 候选基因的 qRT-PCR 验证

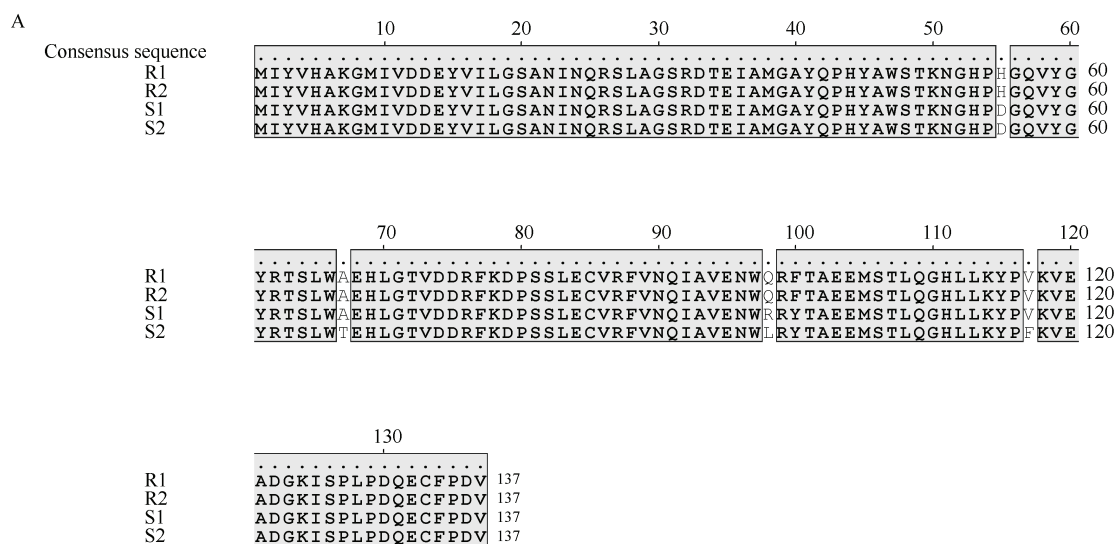
Fig. 3 qRT-PCR verification of candidate genes

R1: 高抗材料 4019; R2: 高抗材料 NMJT; S1: 高感材料黄早四; S2: 高感材料 GEMS61. CK: 无菌水处理; Fg: 接菌处理。0 hpi、1.5 hpi 和 6 hpi 分别表示籽粒在 PDA 平板上培养 0 h、1.5 h 和 6 h。

R1: highly resistant material 4019; R2: highly resistant material NMJT; S1: highly susceptible material Huangzaosi; S2: highly susceptible material GEMS61. CK: sterile water treatment; Fg: inoculation treatment. 0 hpi, 1.5 hpi, and 6 hpi indicated the grains cultured on PDA plate for 0 h, 1.5 h, and 6 h respectively.

Zm00001eb104020、*Zm00001eb195780*、*Zm00001eb240340*、*Zm00001eb070720*、*Zm00001eb070730*、*Zm00001eb309360* 和 *Zm00001eb195760*，推测它们在植物应对逆境胁迫时可能发挥重要作用。对以上基因进行克隆，获得基因 *Zm00001eb104020* 和 *Zm00001eb195780* 的编码区序列，经比较分析发现基因 *Zm00001eb104020* 在 2 个高抗和 2 个高感材料中均编码 137 个氨基酸(图 4-A)；基因 *Zm00001e*

b195780 在高抗材料 R1 中编码 320 个氨基酸，在高抗材料 R2 和 2 个高感材料中编码 318 个氨基酸(图 4-B)。与 2 个高抗材料编码的蛋白序列相比，*Zm00001eb104020* 在 2 个高感材料中编码的蛋白序列第 55、100 位处出现天冬氨酸(D)和酪氨酸(Y) 2 个氨基酸位点共同突变，在高感材料 S2 的 67、98 和 117 处还出现了苏氨酸(T)、亮氨酸(L)、苯丙氨酸(F) 3 个氨基酸位点的突变(图 4-A)；*Zm00001e*



(图 4)

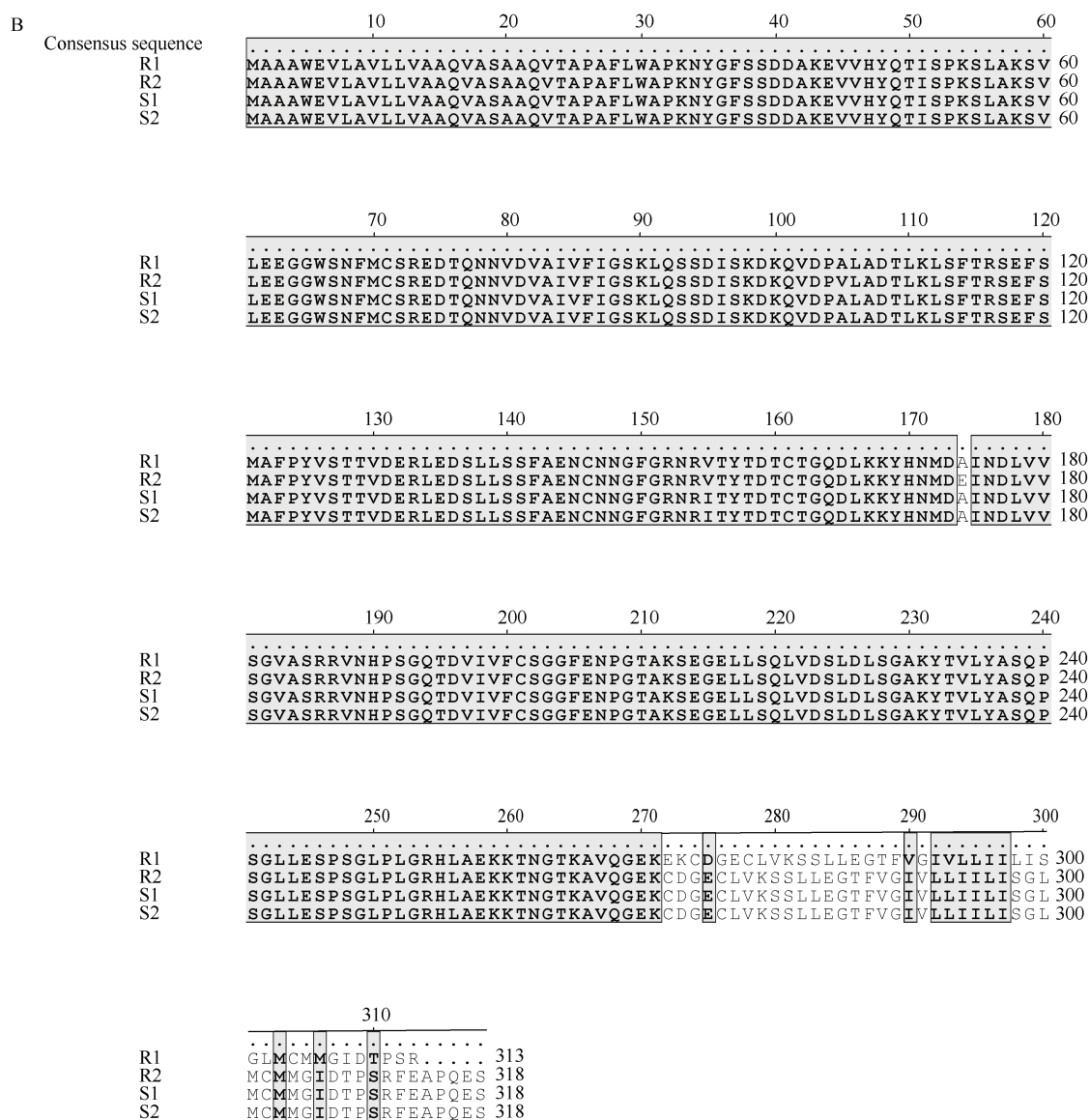


图 4 候选基因 *Zm00001eb104020* (A)和 *Zm00001eb195780* (B)在高抗和高感材料中的氨基酸序列比对

Fig. 4 Amino acid sequence alignment of candidate genes *Zm00001eb104020* (A) and *Zm00001eb195780* (B) between high resistant and high susceptibility inbreds

R1: 高抗材料 4019; R2: 高抗材料 NMJT; S1: 高感材料黄早四; S2: 高感材料 GEMS61。

R1: highly resistant material 4019; R2: highly resistant material NMJT; S1: highly susceptible material Huangzaosi; S2: highly susceptible material GEMS61.

b195780 在 2 个高感材料编码的蛋白序列第 155 处出现异亮氨酸(I)突变, 除此之外高抗材料 R2 和 2 个高感材料均较高抗材料 R1 在 272 和 273 处出现谷氨酸(E)和赖氨酸(K) 2 个位点的缺失(图 4-B)。

2.5 候选基因表达模式分析

2.5.1 候选基因时空表达分析 为探究以上 2 个候选基因在 2 个高抗和 2 个高感材料的不同生长时期和组织中的表达模式, 以苗期的基因表达量作为对照, 对候选基因在植株的根、茎和叶中的相对表达量进行分析。由图 5 可知, 候选基因在 4 个材料

的不同组织中均检测到表达, 但是表达水平各异。

从发育表达特征看, 候选基因 *Zm00001eb104020* 在抗感材料不同组织中均是开花期表达量最高, 其次是授粉后 3 周, 而在授粉后 5 周的表达量降到很低; 候选基因 *Zm00001eb195780* 在抗感材料不同组织中均是授粉后 3 周表达量最高, 其次是授粉后 5 周, 而在开花期和苗期的表达量很低。从组织表达特征看, 候选基因 *Zm00001eb104020* 主要在茎和叶组织中表达, 苗期以茎中表达量最高, 开花期和授粉后 3 周则是以叶中表达量最高, 而在根中除开花

期表达量略有提高外、其他时期表达量均很低; 候选基因 *Zm00001eb195780* 主要在根和叶组织中表达, 苗期和开花期主要在根中表达, 授粉后 3 周和 5 周主要在根和叶中表达量较高, 而在茎中除抗病材料

授粉后的表达量略有提高外、其他时期表达量都很低。由此可见, 这 2 个基因的时空表达特征存在明显差异, 但它们在在不同时期不同组织中的表达量均是抗病材料较感病材料的高(图 5)。

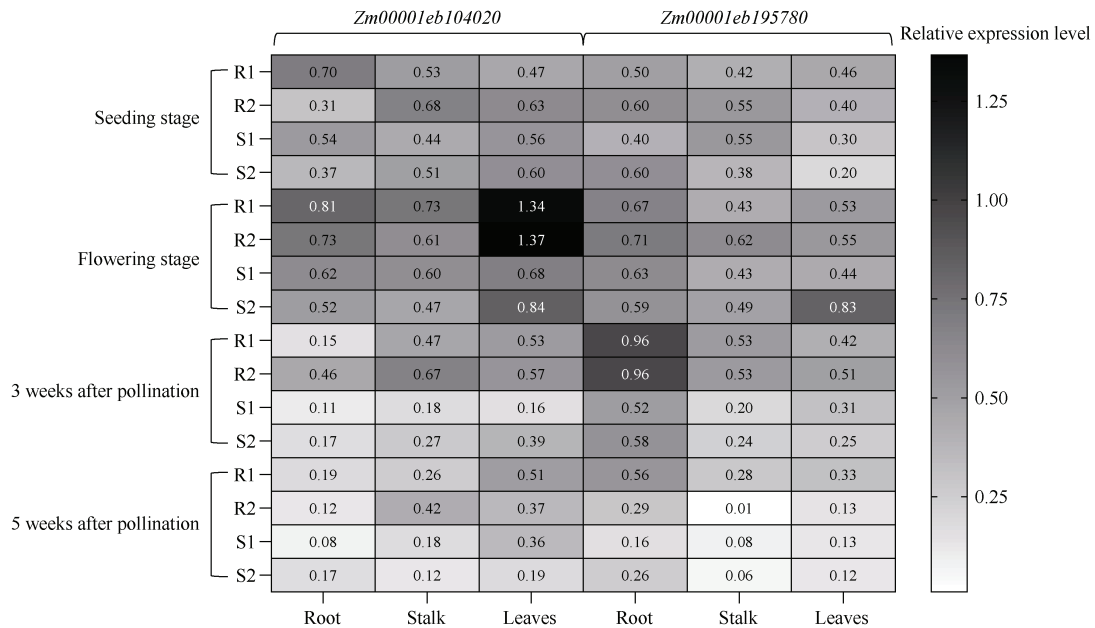


图 5 候选基因 *Zm00001eb104020* 和 *Zm00001eb195780* 在 4 份材料 4 个时期不同组织中的表达特征

Fig. 5 Expression profiles of candidate genes *Zm00001eb104020* and *Zm00001eb195780* in different tissues of four inbreds across four periods

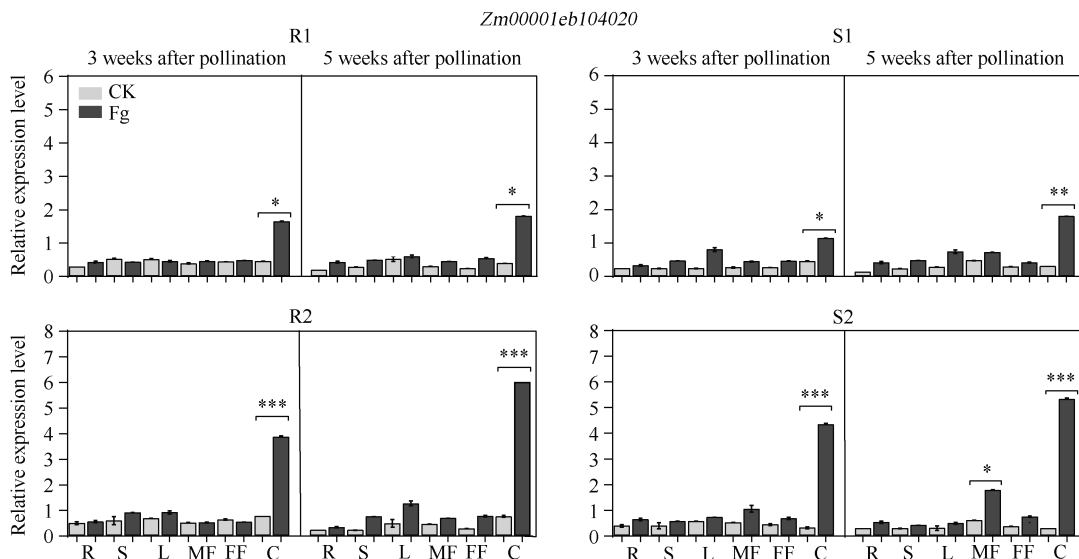
R1: 高抗材料 4019; R2: 高抗材料 NMJT; S1: 高感材料黄早四; S2: 高感材料 GEMS61。

R1: highly resistant material 4019; R2: highly resistant material NMJT; S1: highly susceptible material Huangzaosi; S2: highly susceptible material GEMS61.

2.5.2 候选基因在病原菌感染下的诱导表达分析

对 2 个高抗和 2 个高感材料授粉后 1 周的果穗接种禾谷镰孢孢子悬浮液、并在授粉后 3 周和授粉后 5 周分别取样, 以同一时期接种无菌水的果穗作

为对照, 对根、茎、叶、雄穗、雌穗和籽粒 6 个组织中的基因表达量进行分析, 以探究候选基因在病原菌感染下的诱导表达模式。如图 6 所示, 接种病原菌后, 2 个候选基因在抗感材料的不同组织中均被



(图 6)

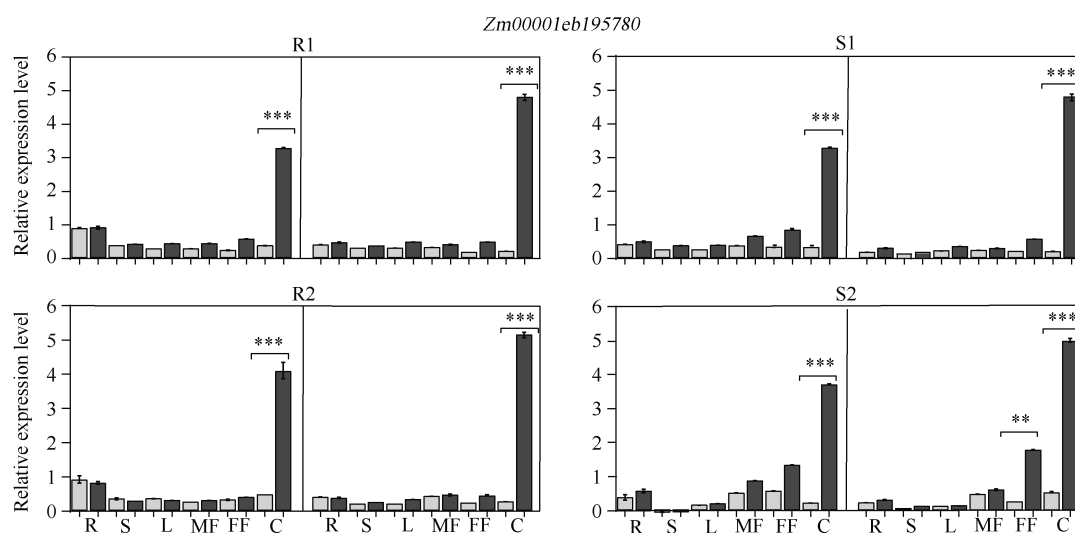


图 6 禾谷镰孢感染下候选基因 *Zm00001eb104020* 和 *Zm00001eb195780* 在 4 份材料 2 个时期不同组织中的表达特征

Fig. 6 Expression profiles of candidate genes *Zm00001eb104020* and *Zm00001eb195780* in different tissues of four inbreds at two periods under *Fg* infection

R1: 高抗材料 4019; R2: 高抗材料 NMJT; S1: 高感材料黄早四; S2: 高感材料 GEMS61。CK: 无菌水处理; Fg: 接菌处理。R: 根; S: 茎; L: 叶; MF: 雄花; FF: 雌花; C: 籽粒。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。

R1: highly resistant material 4019; R2: highly resistant material NMJT; S1: highly susceptible material Huangzaosi; S2: highly susceptible material GEMS61. CK: sterile water treatment; Fg: inoculation treatment. R: root; S: stalk; L: leaves; MF: male flower; FF: female flower; C: corn grain. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。

诱导上调表达,特别是在籽粒中表现出显著的诱导上调,且随接种时期的延长继续上调表达;除此之外,*Zm00001eb104020*在感病材料 S2 接种后 4 周(即授粉后 5 周)的雄花中显著上调表达,*Zm00001eb195780*在感病材料 S2 接种后 4 周(即授粉后 5 周)的雌花中显著上调表达。这些结果暗示,这 2 个候选基因在籽粒中可能发挥重要的抗病功能,同时在特定组织中(如雄花和雌花)也可能参与对病原菌的防御反应。

3 讨论

3.1 不同抗病材料对禾谷镰孢侵染的响应机制

3.1.1 不同抗病材料共同的响应机制 通过对本研究抗病与感病材料间差异基因进行富集分析发现,差异基因较多的富集于植物次生代谢产物、植物激素信号转导、钙信号通路和抗氧化系统等通路。Lanubile 等^[10]研究表明,禾谷镰孢接种于抗性玉米品系后,与次生代谢相关的基因表达显著上调,包括木质素、莽草酸盐、萜类和黄酮类化合物合成相关基因;Yao 等^[37]进一步研究发现,苯丙素生物合成的增强促进了玉米植株防御类化合物的生成,同时细胞色素 P450 家族基因的诱导也调控了多种防御代谢物的合成,如类黄酮、苯丙素、蒽醌、生物碱和植物激素等。由此推测,在禾谷镰孢侵染下抗病材料主要通过调控以上基因的表达来产生抗性反应,

以帮助玉米抵御病原菌侵染。

通过对本研究 2 个抗病材料在接菌处理下较感病材料差异表达共有基因的 GO 和 KEGG 富集分析发现,在禾谷镰孢侵染的早期(0 hpi),上调 DEG 显著富集于应激响应、各类酶活性以及类胡萝卜素、苯丙素等多种次生代谢物合成和植物激素信号传导等通路,下调 DEG 显著富集于脂类物质代谢、糖类物质合成和代谢以及多种氨基酸生物合成等通路;到病原菌侵染中期(1.5 hpi),上调 DEG 显著富集于应激响应、类胡萝卜素和苯丙素等生物合成以及植物激素信号传导等通路,下调 DEG 显著富集于核苷酸代谢、糖类物质合成和代谢以及碳代谢等通路;在病原菌侵染后期(6 hpi),上调 DEG 显著富集于细胞组分、植物激素信号转导、萜类和类胡萝卜素生物合成等通路,下调 DEG 显著富集于各类物质分解代谢、序列特异性 DNA 结合以及糖类物质合成和代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢等通路。由此可见,2 个抗病材料对禾谷镰孢侵染具有相似的响应时序特征。

3.1.2 不同抗病材料特异的响应机制 通过对接种植病原菌后抗病材料 R1 较感病材料 S1 和 S2 显著富集的差异基因分析发现(附图 1),R1 在病原菌侵染早期(0 hpi),快速激活萜类物质合成和半乳糖代谢、显著上调钙离子结合与药物和化学物质响应相关的

基因表达,同时下调核糖体结构、脂质代谢通路、光合作用以及角质层、蜡质和木栓质的生物合成,通过激活多种次生代谢物积累、减少非必要的生理代谢过程起到化学防御的作用;到侵染中期(1.5 hpi),R1 进一步强化有机酸生物合成和过氧化物酶活性,显著上调类黄酮生物合成通路基因并下调 NAD 结合及酶代谢反应,通过调控多种次生代谢产物构建化学防御屏障;到侵染后期(6 hpi),R1 通过维持脂类生物合成和羧酸代谢,同时调控 RNA 的结合方式和细胞器组分相关基因表达,对病原菌侵染表现出防御态势。以上差异表达基因仅在 R1 中显著富集,推测抗病材料 R1 特异性地通过迅速激活次生代谢构建化学防御屏障实现快速抗病,表现出“化学防御”的特性。

相较于 R1 而言,抗病材料 R2 较感病材料 S1 和 S2 显著富集的差异基因有所不同(附图 2),在病原菌侵染早期(0 hpi),R2 主要通过铁离子结合和甘油酯代谢的调控,维持细胞外周稳态和糖类、蛋白质的能量代谢平衡来应对病原菌侵染;到侵染中期(1.5 hpi),R2 显著上调了谷胱甘肽代谢和核苷酸生物合成通路,同时下调核糖体生物合成等基础代谢过程,维持氧化还原平衡和保障遗传物质的稳定性;到侵染后期(6 hpi),R2 的差异表达基因显著富集于遗传信息调控层面,其中同源重组和染色体组织、细胞组分、蛋白质-DNA 复合物等相关基因被显著激活,同时伴随着生长素响应通路的抑制,这种响应模式可能通过增强 DNA 修复能力和调整昼夜节律来提高抗病性。以上差异基因仅在 R2 中被显著富集,推测抗病材料 R2 特异性地通过遗传信息的调控以维持细胞稳态和基因表达实现快速抗病,表现出“稳态维持”的特性。

3.2 抗病候选基因筛选及其鉴定

本研究通过转录组分析结合前期 GWAS 共定位到 24 个基因,根据基因功能注释以及文献报道,从中筛选了 12 个可能具有玉米禾谷镰孢穗腐病抗性的候选基因,并成功克隆了基因 *Zm00001eb104020* 和 *Zm00001eb195780*;结合基因功能注释、基因序列分析和表达模式研究,将基因 *Zm00001eb104020* 和 *Zm00001eb195780* 初步确定为玉米禾谷镰孢穗腐病的抗性候选基因。

候选基因 *Zm00001eb104020* 的注释信息为磷脂酶 D (phospholipase D, PLD),该酶能够特异性地水解磷脂酰胆碱内部的磷酸键,生成磷脂酸(phosphatidic

acid, PA),磷脂酸作为一种重要的脂质第二信使,在植物生长发育和逆境响应中发挥关键作用^[54]。有研究表明,当植物遇到病原菌入侵时,PLD 会集中于病原微生物与细胞质膜的相接部位,通过植物活跃性能和定位的更改,参与对病原菌入侵的抵御^[44];此外,PLD 还参与了种子萌发、花粉生长、病原菌侵染以及低温、干旱等多种生理和病理过程^[55]。通过对 *Zm00001eb104020* 克隆得到的编码区序列分析发现,该基因在 2 个高感材料 55 和 100 位的天冬氨酸(D)和酪氨酸(Y)发生了突变,这 2 个极性氨基酸可能参与蛋白质结构中的氢键或静电相互作用,其突变可能影响蛋白质的构象和功能;此外,该基因还在高感材料 S2 的 67、98 和 117 位发生了苏氨酸(T)、亮氨酸(L)和苯丙氨酸(F)的突变,这些疏水性氨基酸的突变可能改变蛋白质的空间结构,进而影响其与病原菌相关分子的相互作用,这可能是造成高感材料 S2 更易感病的原因之一。

候选基因 *Zm00001eb195780* 的注释信息为 V 型质子 ATP 酶跨膜结构域蛋白,植物细胞内的质子 ATP 酶分为 F 型、P 型和 V 型 3 大类,其中 V 型质子 ATP 酶定位于液泡膜、内质网膜和溶酶体等内膜系统,在植物生长和逆境响应中发挥关键作用,参与根系生长、气孔开闭、花粉管生长、果实酸度调节等生理过程,并在水分、盐胁迫及病原菌侵染等逆境响应中起重要作用。Zhang 等^[38]研究发现,V 型质子 ATP 酶在植物生长与逆境适应过程中具有协同作用,通过遗传途径改造其活性可提高作物的生长能力和抗逆性。Walley 等^[45]的研究进一步指出,*Zm00001eb195780* 基因参与主动运输、细胞内外环境平衡以及神经递质释放等过程。本研究分析发现,*Zm00001eb195780* 在 2 个高感材料 155 位的异亮氨酸(I)发生突变,异亮氨酸(I)是一种疏水性氨基酸,其突变可能影响蛋白质局部结构的稳定性,进而影响其与病原菌相关分子的识别或信号传递,导致高感材料对禾谷镰孢菌的防御能力下降。

本研究还对 2 个候选基因的表达模式进行了分析,结果表明这 2 个候选基因的时空表达特征存在明显差异,但不同时期和组织中的表达量都是抗病材料较感病材料高且在接种禾谷镰孢菌后都在籽粒中被大量诱导显著上调表达。以上结果均表明,这 2 个候选基因与禾谷镰孢穗腐病的抗性相关,但它们对玉米禾谷镰孢穗腐病的具体抗病功能及其作用机制还需后续研究阐明。

4 结论

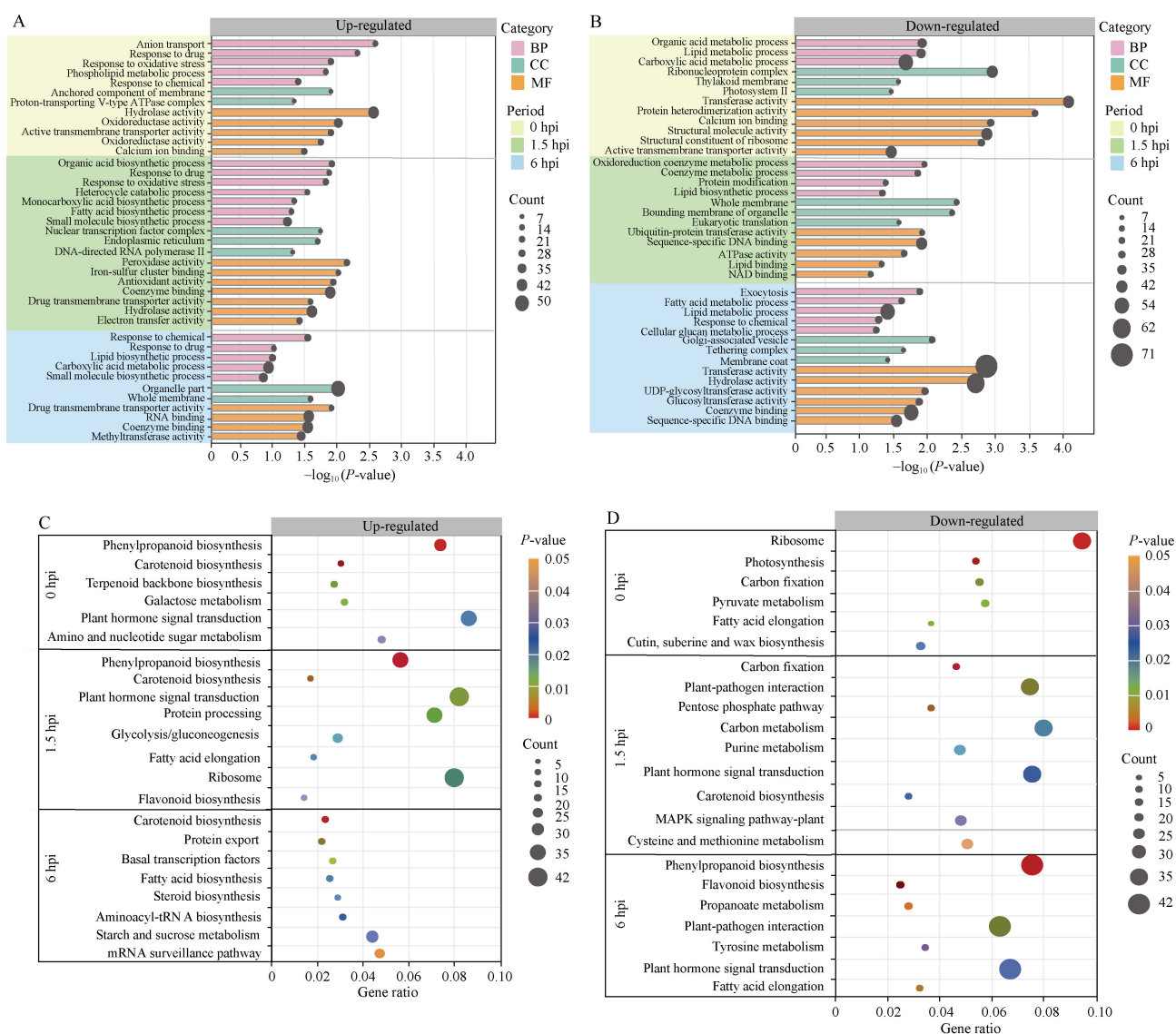
本研究通过对玉米禾谷镰孢穗腐病抗性候选基因的筛选、克隆与初步验证, 预测了12个可能与禾谷镰孢穗腐病抗性相关的候选基因, 成功克隆到了2个抗病候选基因 *Zm00001eb104020* 和 *Zm00001eb195780*, 对这2个候选基因进行了抗感材料间的序列比对与表达模式研究, 取得的结果为玉米禾谷镰孢穗腐病抗性基因的功能解析及其应用提供了一定的理论依据。

References

- [1] Ullstrup A J. An undescribed ear rot of corn caused by *Physalospora zeae*. *Phytopathol*, 1946, 36: 201–212.
- [2] Atanasova-Penichon V, Pons S, Pinson-Gadais L, et al. Chlorogenic acid and maize ear rot resistance: a dynamic study investigating *Fusarium graminearum* development, deoxynivalenol production, and phenolic acid accumulation. *Mol Plant Microbe Interact*, 2012, 25: 1605–1616.
- [3] Beukes I, Rose L J, van Coller G J, et al. Disease development and mycotoxin production by the *Fusarium graminearum* species complex associated with South African maize and wheat. *Eur J Plant Pathol*, 2018, 150: 893–910.
- [4] Tran T N, Lanubile A, Marocco A, et al. Transcriptome profiling of eight *Zea mays* lines identifies genes responsible for the resistance to *Fusarium verticillioides*. *BMC Plant Biol*, 2024, 24: 1107.
- [5] 陈晓娟, 文成敬. 四川省玉米穗腐病研究初报. 西南农业大学学报(自然科学版), 2002, 24(1): 21–23.
Chen X J, Wen C J. Preliminary study of maize ear rot in Sichuan. *J Southwest Agric Univ (Nat Sci Edn)*, 2002, 24(1): 21–23 (in Chinese with English abstract).
- [6] 李辉, 向葵, 张志明, 等. 玉米穗腐病抗性机制及抗病育种研究进展. 玉米科学, 2019, 27(4): 167–174.
Li H, Xiang K, Zhang Z M, et al. Research progress on ear rot resistant mechanism and resistant breeding in maize. *J Maize Sci*, 2019, 27(4): 167–174 (in Chinese with English abstract).
- [7] 张帆, 万雪琴, 潘光堂. 玉米抗穗粒腐病 QTL 定位. 作物学报, 2007, 33: 491–496.
Zhang F, Wan X Q, Pan G T. Molecular mapping of QTL for resistance to maize ear rot caused by *Fusarium moniliforme*. *Acta Agron Sin*, 2007, 33: 491–496 (in Chinese with English abstract).
- [8] 张艳, 谭静. 玉米穗粒腐病的研究进展. 现代农业科技, 2014(21): 121–122.
Zhang Y, Tan J. Research progress on ear rot in maize. *Mod Agric Sci Technol*, 2014(21): 121–122 (in Chinese with English abstract).
- [9] Folcher L, Jarry M, Weissenberger A, et al. Comparative activity of agrochemical treatments on mycotoxin levels with regard to corn borers and *Fusarium* mycoflora in maize (*Zea mays* L.) fields. *Crop Prot*, 2009, 28: 302–308.
- [10] Lanubile A, Maschietto V, Borrelli V M, et al. Molecular basis of resistance to *Fusarium* ear rot in maize. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1774.
- [11] 段灿星, 王晓鸣, 宋风景, 等. 玉米抗穗腐病研究进展. 中国农业科学, 2015, 48: 2152–2164.
Duan C X, Wang X M, Song F J, et al. Advances in research on maize resistance to ear rot. *Sci Agric Sin*, 2015, 48: 2152–2164 (in Chinese with English abstract).
- [12] 席靖豪. 黄淮海夏玉米穗腐病原多样性分析及玉米新品种抗病性鉴定. 河南农业大学硕士学位论文, 河南郑州, 2018.
Xi J H. Pathogen Diversity of Summer Maize Ear Rot in Huang-Huai-Hai Region and Resistance Identification of New Maize Cultivars. MS Thesis of Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan, China, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [13] 程璐, 陈家斌, 张艺璇, 等. 两种优势病原菌玉米穗腐病的研究比较. 云南大学学报(自然科学版), 2022, 44: 647–654.
Cheng L, Chen J B, Zhang Y X, et al. Research comparison of two dominant pathogens on maize ear rot. *J Yunnan Univ (Nat Sci Edn)*, 2022, 44: 647–654 (in Chinese with English abstract).
- [14] 秦子惠, 任旭, 江凯, 等. 我国玉米穗腐病致病镰孢种群及禾谷镰孢复合种的鉴定. 植物保护学报, 2014, 41: 589–596.
Qin Z H, Ren X, Jiang K, et al. Identification of *Fusarium* species and *F. graminearum* species complex causing maize ear rot in China. *J Plant Prot*, 2014, 41: 589–596 (in Chinese with English abstract).
- [15] 张小飞, 邹成佳, 崔丽娜, 等. 西南地区玉米穗腐病原分离鉴定及接种方法研究. 西南农业学报, 2012, 25: 2078–2082.
Zhang X F, Zou C J, Cui L N, et al. Identification of pathogen causing maize ear rot and inoculation technique in southwest China. *Southwest China J Agric Sci*, 2012, 25: 2078–2082 (in Chinese with English abstract).
- [16] 苏爱国, 王帅帅, 段赛茹, 等. 玉米抗禾谷镰孢菌穗粒腐病种质资源鉴定. 植物遗传资源学报, 2021, 22: 971–978.
Su A G, Wang S S, Duan S R, et al. Identification for ear rot resistance against *Fusarium graminearum* in maize germplasm. *J Plant Genet Resour*, 2021, 22: 971–978 (in Chinese with English abstract).
- [17] Mesterházy Á, Lemmens M, Reid L M. Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. in maize—a review. *Plant Breed*, 2012, 131: 1–19.
- [18] 宋立秋, 魏利民, 王振营, 等. 亚洲玉米螟与串珠镰孢菌复合侵染对玉米产量损失的影响. 植物保护学报, 2009, 36: 487–490.
Song L Q, Wei L M, Wang Z Y, et al. Effect of infestation by the Asian corn borer together with *Fusarium verticillioides* on corn yield loss. *J Plant Prot*, 2009, 36: 487–490 (in Chinese with English abstract).
- [19] 王宝宝. 玉米穗腐病致病镰孢菌鉴定与寄主抗性. 中国农业科学院硕士学位论文, 北京, 2020.
Wang B B. Identification of Pathogenic *Fusarium* Species Causing Maize Ear Rot and Study on Host Resistance. MS Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China, 2020 (in Chinese with English abstract).
- [20] Gauthier L, Bonnin-Verdal M N, Marchegay G, et al. Fungal bio-transformation of chlorogenic and caffeic acids by *Fusarium graminearum*: new insights in the contribution of phenolic acids to resistance to deoxynivalenol accumulation in cereals. *Int J*

- Food Microbiol, 2016, 221: 61–68.
- [21] Yuan G S, Shi J H, Zeng C, et al. Integrated analysis of transcriptomics and defense-related phytohormones to discover hub genes conferring maize *Gibberella* ear rot caused by *Fusarium graminearum*. BMC Genomics, 2024, 25: 733.
- [22] 杨俊伟, 王建军, 赵变平, 等. 玉米新品种抗禾谷镰孢菌穗腐病鉴定与评价. 河北农业科学, 2020, 24(4): 47–49.
Yang J W, Wang J J, Zhao B P, et al. Identification and evaluation of resistance of maize hybrids to *Fusarium graminearum* ear rot. J Hebei Agric Sci, 2020, 24(4): 47–49 (in Chinese with English abstract).
- [23] 夏玉生, 郭成, 温胜慧, 等. 玉米种质抗拟轮枝镰孢与禾谷镰孢穗腐病鉴定及抗性多样性分析. 植物遗传资源学报, 2022, 23: 61–71.
Xia Y S, Guo C, Wen S H, et al. Identification of maize germplasm resistant to *Fusarium* ear rot and *Gibberella* ear rot and genetic diversity analysis of resistant lines. J Plant Genet Resour, 2022, 23: 61–71 (in Chinese with English abstract).
- [24] 段灿星, 崔丽娜, 夏玉生, 等. 玉米种质资源对拟轮枝镰孢与禾谷镰孢穗腐病的抗性精准鉴定与分析. 作物学报, 2022, 48: 2155–2167.
Duan C X, Cui L N, Xia Y S, et al. Precise characterization and analysis of maize germplasm resources for resistance to *Fusarium* ear rot and *Gibberella* ear rot. Acta Agron Sin, 2022, 48: 2155–2167 (in Chinese with English abstract).
- [25] 何玥, 郭爽, 王栋, 等. 玉米地方种质资源对禾谷镰孢菌穗腐病的抗性评价. 耕作与栽培, 2023, 43(5): 1–5.
He Y, Guo S, Wang D, et al. Identification for ear rot resistance against *Fusarium graminearum* in maize Landrace germplasm. Tillage Cult, 2023, 43(5): 1–5 (in Chinese with English abstract).
- [26] 陈鸽, 王敏, 周德龙, 等. 523 份玉米自交系对禾谷镰孢穗腐病和灰斑病的抗性鉴定. 中国农业大学学报, 2025, 30(1): 27–37.
Chen G, Wang M, Zhou D L, et al. Resistance evaluation of 523 maize inbred lines to *Gibberella* ear rot and gray leaf spot. J China Agric Univ, 2025, 30(1): 27–37 (in Chinese with English abstract).
- [27] Butrón A, Reid L M, Santiago R, et al. Inheritance of maize resistance to *Gibberella* and *Fusarium* ear rots and kernel contamination with deoxynivalenol and fumonisins. Plant Pathol, 2015, 64: 1053–1060.
- [28] Martin M, Dhillon B S, Miedaner T, et al. Inheritance of resistance to *Gibberella* ear rot and deoxynivalenol contamination in five flint maize crosses. Plant Breed, 2012, 131: 28–32.
- [29] Xia Y S, Wang B B, Zhu L H, et al. Identification of a *Fusarium* ear rot resistance gene in maize by QTL mapping and RNA sequencing. Front Plant Sci, 2022, 13: 954546.
- [30] Reinprecht Y, Wu X G, Yan S, et al. A microarray-based approach for identifying genes for resistance to *Fusarium graminearum* in maize (*Zea mays* L.). Cereal Res Commun, 2008, 36: 253–259.
- [31] Yuan G S, Chen B F, Peng H, et al. QTL mapping for resistance to ear rot caused by *Fusarium graminearum* using an IBM Syn10 DH population in maize. Mol Breed, 2020, 40: 91.
- [32] Akohoue F, Miedaner T. Meta-analysis and co-expression analysis revealed stable QTL and candidate genes conferring resistances to *Fusarium* and *Gibberella* ear rots while reducing mycotoxin contamination in maize. Front Plant Sci, 2022, 13: 1050891.
- [33] 王梓钰, 李世界, 闻竞, 等. 玉米禾谷镰孢穗腐病抗性的 QTL 定位. 玉米科学, 2022, 30(4): 31–39.
Wang Z Y, Li S J, Wen J, et al. QTL mapping of resistance to *Gibberella* ear rot in maize. J Maize Sci, 2022, 30(4): 31–39 (in Chinese with English abstract).
- [34] 周帆, 杨喆, 崔婷茹, 等. 玉米 *ZmBT2b* 基因在抵抗禾谷镰孢侵染中的功能研究. 河北农业大学学报, 2024, 47(1): 19–28.
Zhou F, Yang Z, Cui T R, et al. Function of *ZmBT2b* gene in maize resistance to *Fusarium graminearum*. J Hebei Agric Univ, 2024, 47(1): 19–28 (in Chinese with English abstract).
- [35] 闻竞, 邢跃先, 沈彦岐, 等. 玉米禾谷镰孢穗腐病抗性基因的挖掘. 分子植物育种, 网络首发[2025-01-14], <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=FZZW20250113007&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
Wen J, Xing Y X, Shen Y Q, et al. Exploration of specific gene(s) for ear rot resistance to *Fusarium graminearum* in maize. Mol Plant Breed, Published online [2025-01-14], <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=FZZW20250113007&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ> (in Chinese with English abstract).
- [36] 高佳琪. 玉米穗腐病抗性与花期性状的全基因组关联分析. 云南大学硕士学位论文, 云南昆明, 2022.
Gao J Q. Genome-wide Association Study of Ear Rot Resistance and Flowering Traits of Maize. MS Thesis of Yunnan University, Kunming, Yunnan, China, 2022 (in Chinese with English abstract).
- [37] Yao L S, Li Y M, Ma C Y, et al. Combined genome-wide association study and transcriptome analysis reveal candidate genes for resistance to *Fusarium* ear rot in maize. J Integr Plant Biol, 2020, 62: 1535–1551.
- [38] Zhang Y, Peng Y X, Liu J, et al. Tetratricopeptide repeat protein SIREC2 positively regulates cold tolerance in tomato. Plant Physiol, 2023, 192: 648–665.
- [39] Guo J, Yao Q, Dong J, et al. Immunophilin FKB20-2 participates in oligomerization of photosystem I in *Chlamydomonas*. Plant Physiol, 2024, 194: 1631–1645.
- [40] 段明. 低温胁迫下番茄类囊体膜抗坏血酸过氧化物酶基因的表达和功能研究. 山东农业大学博士学位论文, 山东泰安, 2012.
Duan M. Expression and Functional Analysis of the *LetAPX* in Tomato under Chilling Stress. PhD Dissertation of Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong, China, 2012 (in Chinese with English abstract).
- [41] Yin W C, Xiao Y H, Niu M, et al. ARGONAUTE2 enhances grain length and salt tolerance by activating *BIG GRAIN3* to modulate cytokinin distribution in rice. Plant Cell, 2020, 32: 2292–2306.
- [42] 查笑君, 马伯军, 潘建伟, 等. 植物富亮氨酸重复类受体蛋白激酶的研究进展. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2010, 33(1): 7–12.
Zha X J, Ma B J, Pan J W, et al. Research advances in leucine-rich repeat receptor-like protein kinases in plants. J Zhejiang Norm Univ (Nat Sci), 2010, 33(1): 7–12 (in Chinese with English abstract).
- [43] 安炎黄. 磷脂酶参与冬凌草甲素对拟南芥的化感潜能作用. 西北师范大学硕士学位论文, 甘肃兰州, 2019.
An Y H. Phospholipase is Involved in the Allelopathy of Oridonin in *Arabidopsis thaliana*. MS Thesis of Northwest Normal

- University, Lanzhou, Gansu, China, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [44] 王秀娟, 高山, 王国泽. 磷脂酶 D 的抗逆特性及其活性检测研究. 湖北农业科学, 2014, 53: 998–1000.
- Wang X J, Gao S, Wang G Z. Characteristics of stress tolerance and activity detection of phospholipase D. Hubei Agric Sci, 2014, 53: 998–1000 (in Chinese with English abstract).
- [45] Walley J W, Sartor R C, Shen Z X, et al. Integration of omic networks in a developmental atlas of maize. Science, 2016, 353: 814–818.
- [46] 陈道波, 王教瑜, 肖琛闻, 等. ABC 转运蛋白结构及在植物病原真菌中的功能研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2021, 48: 309–316.
- Chen D B, Wang J Y, Xiao C W, et al. Research progress in structure of ABC transporters and their function in pathogenic fungi. Prog Biochem Biophys, 2021, 48: 309–316 (in Chinese with English abstract).
- [47] Kovalchuk A, Driessen A J M. Phylogenetic analysis of fungal ABC transporters. BMC Genomics, 2010, 11: 177.
- [48] Aryal B, Xia J, Hu Z H, et al. An LRR receptor kinase controls ABC transporter substrate preferences during plant growth-defense decisions. Curr Biol, 2023, 33: 2008–2023.e8.
- [49] 位欣欣, 兰海燕. 植物 MYB 转录因子调控次生代谢及逆境响应的研究进展. 生物技术通报, 2022, 38(8): 12–23.
- Wei X X, Lan H Y. Advances in the regulation of plant MYB transcription factors in secondary metabolism and stress response. Biotechnol Bull, 2022, 38(8): 12–23 (in Chinese with English abstract).
- [50] 蒋滔. 玉米抗灰斑病主效 QTL-*qGLS8* 候选基因的功能鉴定与分析. 贵州大学硕士学位论文, 贵州贵阳, 2023.
- Jiang T. Functional Identification and Analysis of Candidate Gene QTL-*qGLS8* for Resistance to Gray Leaf Spot in Maize. MS Thesis of Guizhou University, Guiyang, Guizhou, China, 2023 (in Chinese with English abstract).
- [51] Armijo G, Salinas P, Monteoliva M I, et al. A salicylic acid-induced lectin-like protein plays a positive role in the effector-triggered immunity response of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* Avr-Rpm1. Mol Plant Microbe Interact, 2013, 26: 1395–1406.
- [52] Nie Y B, Ji W Q. Cloning and characterization of disease resistance protein RPM1 genes against powdery mildew in wheat line N9134. Cereal Res Commun, 2019, 47: 473–483.
- [53] Wang A J, Shu X Y, Jing X, et al. Identification of rice (*Oryza sativa* L.) genes involved in sheath blight resistance via a genome-wide association study. Plant Biotechnol J, 2021, 19: 1553–1566.
- [54] 陈雷. 玉米磷脂酶 D 基因家族的克隆及功能分析. 四川农业大学硕士学位论文, 四川雅安, 2019.
- Chen L. Cloning and Functional Analysis of Maize Phospholipase D Gene Family. MS Thesis of Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan, China, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [55] Li J X, Yu F, Guo H, et al. Crystal structure of plant PLD α 1 reveals catalytic and regulatory mechanisms of eukaryotic phospholipase D. Cell Res, 2020, 30: 61–69.

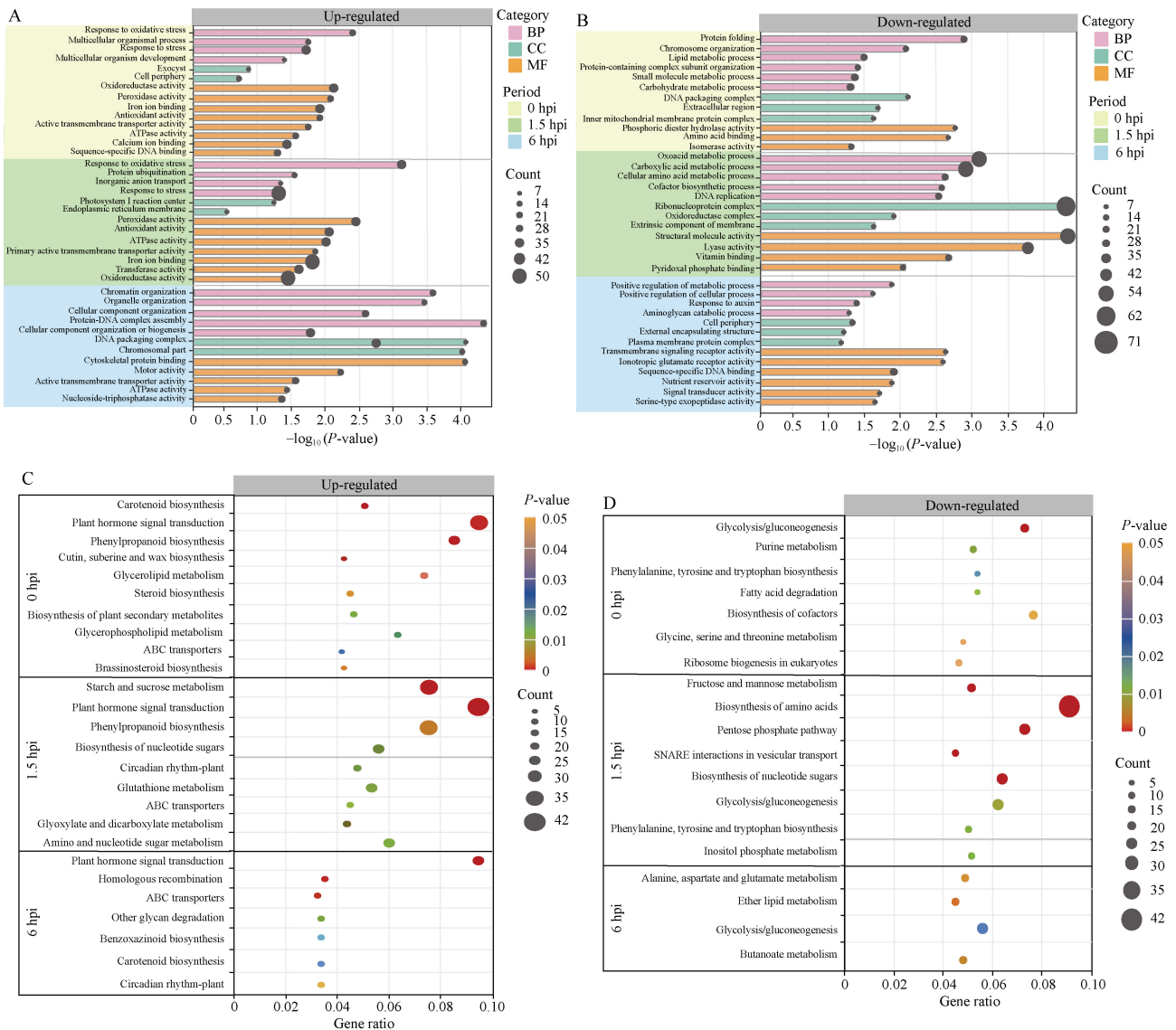


附图 1 接菌处理下高抗材料 R1 和高感材料 S1、S2 间 DEGs 在 3 个时间点的 GO 和 KEGG 富集分析

Fig. S1 GO and KEGG enrichment analysis of DEGs between highly resistant inbred R1 and highly susceptible inbreds S1, S2 at three sampling time points

A: 上调 DEGs 的 GO 分析; B: 下调 DEGs 的 GO 分析; C: 上调 DEGs 的 KEGG 分析; D: 下调 DEGs 的 KEGG 分析。0 hpi、1.5 hpi 和 6 hpi 分别表示籽粒在 PDA 平板上培养 0 h、1.5 h 和 6 h。BP: 生物过程; CC: 细胞组分; MF: 分子功能。

A: GO analysis of up-regulated DEGs; B: GO analysis of down-regulated DEGs; C: KEGG analysis of up-regulated DEGs; D: KEGG analysis of down-regulated DEGs. 0 hpi, 1.5 hpi, and 6 hpi indicated the grains cultured on PDA plate for 0 h, 1.5 h, and 6 h, respectively. BP: biological process; CC: cellular component; MF: molecular function.



附图 2 接菌处理下高抗材料 R2 和高感材料 S1、S2 间 DEG 在 3 个时间点的 GO 和 KEGG 富集分析

Fig. S2 GO and KEGG enrichment analysis of DEGs between highly resistant inbred R2 and highly susceptible inbreds S1, S2 at three sampling time points

A: 上调 DEG 的 GO 分析; B: 下调 DEG 的 GO 分析; C: 上调 DEG 的 KEGG 分析; D: 下调 DEG 的 KEGG 分析。0 hpi、1.5 hpi 和 6 hpi 分别表示籽粒在 PDA 平板上培养 0 h、1.5 h 和 6 h。BP: 生物过程; CC: 细胞组分; MF: 分子功能。

A: GO analysis of up-regulated DEGs; B: GO analysis of down-regulated DEGs; C: KEGG analysis of up-regulated DEGs; D: KEGG analysis of down-regulated DEGs. 0 hpi, 1.5 hpi, and 6 hpi indicated the grains cultured on PDA plate for 0 h, 1.5 h, and 6 h, respectively. BP: biological process; CC: cellular component; MF: molecular function.