

OsERF93参与调控水稻纹枯病抗性的研究

岳轩宇^{1,2} 谢文亚^{1,2,3,*} 冯志明^{1,2,3} 陈宗祥^{1,2,3} 胡珂鸣^{1,2} 左示敏^{1,2,3,*}

(¹江苏省作物基因组学和分子育种重点实验室/生物育种钟山实验室/植物功能基因组学教育部重点实验室, 扬州大学 农学院, 江苏 扬州 225009; ²江苏省粮食作物现代产业技术协同创新中心/江苏省作物遗传生理重点实验室, 扬州大学, 江苏 扬州 225009; ³扬州现代种子创新研究所, 江苏 扬州 225600; *通讯作者, email: smzuo@yzu.edu.cn; wyxie@yzu.edu.cn)

Function of *OsERF93* in Regulating Resistance to Sheath Blight in Rice

YUE Xuanyu^{1,2}, XIE Wenya^{1,2,3,*}, FENG Zhiming^{1,2,3}, CHEN Zongxiang^{1,2,3}, HU Keming^{1,2}, ZUO Shimin^{1,2,3,*}

(¹Jiangsu Key Laboratory of Crop Genomics and Molecular Breeding/Zhongshan Biological Breeding Laboratory/Key Laboratory of Plant Functional Genomics of the Ministry of Education, Agricultural College of Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; ²Jiangsu Co-Innovation Center for Modern Production Technology of Grain Crops/Jiangsu Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; ³Yangzhou Modern Seed Innovation Institute, Yangzhou 225600, China; *Corresponding author, email: smzuo@yzu.edu.cn; wyxie@yzu.edu.cn)

Abstract: 【Objective】This study aims to elucidate the function and mechanism of the ERF transcription factor *OsERF93* in rice sheath blight resistance, providing genetic resources for disease-resistant breeding. 【Method】The expression pattern, transcriptional regulatory function, and subcellular localization of *OsERF93* were analyzed using RT-qPCR and transcriptional activation assays in rice protoplasts. Transgenic overexpression and knockout lines were constructed to investigate the role of *OsERF93* in sheath blight resistance. Expression differences of salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), and ethylene (ET)-related signaling genes were compared before and after inoculation in transgenic lines. Additionally, agronomic traits of overexpression lines and controls were evaluated. 【Result】*OsERF93* was highly expressed in rice leaves and leaf sheaths and induced by sheath blight fungus infection. The encoded protein localized to the nucleus and cell membrane, exhibiting transcriptional activation activity. Overexpression of *OsERF93* significantly enhanced sheath blight resistance, while knockout lines showed reduced resistance. JA biosynthesis gene *OsAOS2* and certain *PR* genes were upregulated in overexpression lines and downregulated in knockout lines. Overexpression lines exhibited slightly reduced plant height and thousand-grain weight compared to wild-type controls but had significantly higher grain number per panicle. No significant differences were observed in tiller number, primary branch number, and panicle length between overexpression lines and controls. 【Conclusion】The results indicate that *OsERF93* positively regulates rice sheath blight resistance by activating the jasmonic acid signaling pathway, offering a novel genetic resource for rice disease-resistant breeding.

Keywords: rice; sheath blight; *OsERF93*; jasmonic acid; agronomic trait

摘要: 【目的】本研究旨在解析 ERF 类转录因子 *OsERF93* 在水稻抗纹枯病中的功能与机制, 为抗病育种提供基因资源。【方法】利用 RT-qPCR、水稻原生质体转录激活等方法, 分析了 *OsERF93* 的表达模式、转录调控功能和亚细胞定位; 通过构建转基因过表达和敲除株系, 研究了 *OsERF93* 调控纹枯病抗性的功能, 进而比较分析了水杨酸、茉莉酸和乙烯信号相关基因在转基因系接种前后的表达差异, 以及超表达转基因系与对照间的农艺性状差异。【结果】*OsERF93* 在水稻叶片和叶鞘组织中高表达, 受纹枯病菌侵染诱导表达; 其编码蛋白定位于细胞核和细胞膜中, 具有转录激活活性; *OsERF93* 过表达显著增强了水稻纹枯病抗性, 而敲除则显著减弱抗病性; 茉莉酸合成基因 *OsAOS2* 以及部分 *PR* 基因在 *OsERF93* 过表达系和敲除系中分别明显上调和下调表达; *OsERF93* 过表达系的株高和千粒重略低于野生型对照, 但每穗粒数显著高于对照, 其他性状如分蘖数、一次枝梗数和穗长与对照间无显著差异【结论】*OsERF93* 通过激活茉莉酸信号途径正调控水稻的纹枯病抗性, 为水稻抗病育种提供了一个新的基因资源。

关键词: 水稻; 纹枯病; *OsERF93*; 茉莉酸; 农艺性状

收稿日期: 2025-02-11; 修改稿收到日期: 2025-05-23。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(32272110, 32200430); 生物育种钟山实验室项目(ZSBL-KY2023-06-3); 扬州市现代农业项目(YZ2024045)。

水稻纹枯病(sheath blight, ShB)是由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn, *R. solani*)引起的一类重要真菌性病害。该病原菌属于腐生型真菌,可快速侵染并诱导水稻叶鞘组织细胞死亡,引发水渍状病斑^[1,2]。该菌的寄主范围广泛,不仅包括水稻、小麦、玉米等主要农作物,还包括豆科和茄科中的多种作物^[3]。纹枯病的初期病斑通常出现在水稻基部叶鞘,并逐步向叶片组织扩展,在适宜条件下,纹枯病可在短期内造成水稻叶片的干枯死亡^[4,5],其严重发病可造成 30%~50% 的产量损失^[6,7],严重影响水稻的产量和品质^[8,9]。因此,挖掘水稻纹枯病抗性基因资源对创制纹枯病抗性育种材料具有重要意义。

AP2/ERF 家族是一类在植物中广泛存在的转录因子大家族,ERF 转录因子含有一个由 60~70 个氨基酸组成的保守结构域,该结构域对于识别靶基因中的顺式作用元件至关重要^[10]。根据 AP2/ERF 结构域的数量及结合序列的不同,该家族被划分为 AP2、ERF、RAV 和 Soloist 四个亚家族^[11]。AP2 亚家族有两个重复的 AP2/ERF 结构域^[12]; RAV 家族蛋白除了 AP2/ERF 结构域外,还具有一个 VP1/ABI3 结合结构域; ERF 家族的蛋白则只有一个 AP2/ERF 结构域^[13]。在 ERF 家族内,根据可以识别的顺式作用元件又可以分为 ERF 和 CBF/DREB 两个亚家族,其中 ERF 亚家族基因通过识别 AGCCGCC 序列来与下游启动子结合, CBF/DREB 亚家族成员则识别 AGCCGAC 序列^[14]。它们通过与特定的顺式作用元件结合,调控下游靶基因的表达,从而影响植物的生理和发育过程^[15]。目前,水稻中共发现 165 个 AP2/ERF 家族基因,包括 ERF 亚家族基因 136 个, AP2 亚家族基因 24 个, RAV 亚家族基因 5 个^[16]。

AP2/ERF 超家族的转录因子在调控植物生长发育过程中发挥着重要作用。例如, AP2 亚家族中的成员 *Crl5* 参与调控根冠的发育^[17], 而 *OsIDS1* 基因在水稻中则抑制花的形成^[18]。在 ERF 亚家族中, *OsERF48* 和 *OsERF3* 能够影响水稻根的生成^[19,20], 而 *OsSNB* 基因的突变则会导致花器官发育异常^[21]。该家族转录因子在植物对生物胁迫的响应中同样扮演着核心角色,特别是在水稻的抗病机制中^[22,23]。ERF 亚家族的多个成员已被证实与水稻的抗病性密切相关。例如, Tran 等^[24]的研究揭示了 *OsERF123* 在响应水稻白叶枯病和水稻细菌性条斑病中发挥作用; 另一方面, Tezuka 等^[25]的研究表明 *OsERF83* 能够正向调节水稻对稻瘟病的抗性; 而 Xie 等^[26]则发现 *OsERF65* 通过抑制活性氧的分解,降低水稻

对纹枯病的抗性。上述研究表明, AP2/ERF 超家族的成员在植物的生长发育和抗病过程中具有重要作用。

抗性基因的鉴定和利用是提高水稻纹枯病抗性的关键。虽然目前尚未发现单一的主效抗性基因,但多个微效基因的累积效应可能对提高水稻的抗性具有重要作用^[27]。这些微效基因可能通过调节水稻的生理和生化过程,增强其对 *R. solani* 侵染的防御能力^[28-30]。通过比较抗感差异材料的转录组,可以揭示纹枯病的正负调控因子,为开发抗病水稻品种提供候选基因^[31,32]。这些研究成果不仅加深了我们对纹枯病发病机制的理解,也为未来的抗病育种提供了科学依据。因此,通过基因筛选和分子育种技术,可以有效地提高水稻对纹枯病的抗性,进而最终减少对化学农药的依赖并实现水稻生产的可持续发展。

1 材料与方法

1.1 植物材料与纹枯病菌

本研究涉及的水稻材料有日本晴(NIP)、Lemont、YSBR1 以及徐稻 3 号(XD3)。其中,徐稻 3 号曾经是江苏主栽的粳稻品种,具有高产优质特性,但是易感纹枯病^[33]。本研究利用其为转基因受体材料,研究 *OsERF93* 的过表达和敲除对水稻纹枯病抗性的影响; YSBR1 和 Lemont 分别为公认的纹枯病抗病和感病对照^[34],分别用于比较目标基因在抗感品种间的表达差异。本研究使用的大肠杆菌菌株为 DH5 α ,农杆菌菌株为 EHA105,酵母菌株为 AH109,在纹枯病接种中使用的是立枯丝核菌菌株 YN-19。

1.2 RNA 提取与 qPCR 检测

本研究使用南京诺唯赞生物科技有限公司提供的 FreeZol Reagent 试剂盒提取水稻叶片叶鞘总 RNA,每个样本在液氮下充分研磨,称取 100 mg 作为起始量。每个样本均为三个不同植株/处理材料叶片叶鞘混合而成。在反转录过程中,本研究选用诺唯赞公司的反转录试剂(HiScript III RT Super Mix for qPCR, +gDNA wiper),测量水稻总 RNA 浓度后取 1 μ g 用于反转录。最后使用罗氏公司的 Light Cycler 480 II 实时荧光定量 PCR 仪进行基因表达量检测,每个样品设置 3 次技术重复。实验所用的引物信息见附表 1。

1.3 载体构建

通过 PCR 技术从 XD3 的 cDNA 中扩增得到

OsERF93 的 CDS 序列, 与经过 *Kpn* I 和 *Bam* H I 双酶切的 pCAMBIA1300 载体进行同源重组进而获得过表达载体。同时, 设计了特异性靶向 *OsERF93* 基因的 sgRNA, 并构建了敲除该基因的 CRISPR/Cas9 重组载体。将 *OsERF93* 过表达载体经过 *Kpn* I 和 *Bam* H I 双酶切后与经过同样酶切的 pU1301-GFP 载体连接起来构建其亚细胞定位载体。将 *OsERF7*、*OsERF65* 和 *OsERF93* 的 CDS 克隆至 pGBKT7 载体中, 构建了相应的酵母表达载体。

1.4 组织特异性表达检测

取孕穗期的日本晴水稻的根、茎、叶、叶鞘以及穗等组织, 在液氮中充分研磨并进行 RNA 提取, 取 1 μ g 的 RNA 进行反转录后, 采用 RT-qPCR 技术检测 *OsERF93* 的基因表达情况, 每个样品设 3 次技术重复。

1.5 乙烯和 AOA 处理

本研究采用 0.05% 乙烯利(Ethephon, ET)和 0.5% 氨基氧乙酸(Aminooxyacetic acid, AOA)作为处理剂, 在水稻的四叶一心期对整个植株进行了喷施处理。乙烯利是一种常用的乙烯释放剂, 能够释放乙烯气体并调控乙烯信号通路相关基因的特异性表达; 氨基氧乙酸是一种乙烯合成抑制剂, 通过阻断植物内源性乙烯的合成过程, 抑制乙烯信号通路的反应^[34]。喷施操作以药液从水稻叶片自然滴落作为喷施完成的标准。完成喷施后, 立即将植株置于密封环境中, 以确保内部气体浓度的稳定性。在喷施处理后的不同时间点, 采集整株水稻作为样本, 并迅速将其投入液氮中进行冷冻保存。提取总 RNA 并测量 *OsERF93* 基因相对表达量。

1.6 诱导表达模式分析

在水稻孕穗期, 对水稻抗病品种 YSBR1 和感病品种 Lemont 进行纹枯病接种处理, 并在不同的时间点采集了纹枯病接种点的水稻叶鞘样本, 同时设置了未接种纹枯病的对照组。所有采集的样本均迅速放入液氮中进行冷冻保存, 以确保 RNA 的完整性。随后, 从每个样本中提取 RNA, 并利用 RT-qPCR 技术检测 *OsERF93* 基因的表达量。

1.7 *OsERF93* 的亚细胞定位

将酶解液在 55 $^{\circ}$ C 水浴锅孵育 10 min 后自然冷却。接着, 将水稻及叶鞘切成 1~2 mm 碎块浸入酶解液中, 在室温下抽真空 30 min, 黑暗中振荡酶解 4~5 h 以释放原生质体。然后, 使用 300 目金属筛过滤酶解液, 缓慢离心收集原生质体。加入 W5 溶液, 缓慢离心后去除上清, 重悬原生质体。再次缓

慢离心收集原生质体, 弃上清加入 MMA 重悬原生质体放置在暗处备用。将 5 μ g 质粒与 100 μ L 原生质体混合, 加入 110 μ L PEG-CaCl₂ 轻柔混匀并室温放置 12 min, 随后加入 800 μ L W5 溶液终止反应, 缓慢离心并弃上清。加入 1 mL 的 WI 溶液重悬原生质体并转入细胞培养板中, 在 26~28 $^{\circ}$ C 黑暗条件下培养 12~16 h。最后, 使用激光共聚焦显微镜观察 GFP 荧光。

1.8 *OsERF93* 转录因子自激活活性鉴定

将构建好的 BD-*OsERF* 酵母载体与 pGADT7 载体进行共转化, 以酵母细胞感受态为宿主。转化后的酵母细胞涂布于 Leu/Trp 缺陷型培养基, 并在 28 $^{\circ}$ C 条件下培养 2~3 d, 进一步在 Leu/Trp 缺陷型培养基中挑选出单克隆酵母细胞, 并进行不同浓度梯度稀释, 将稀释后的酵母细胞点样于 Leu/Trp/His/Ade 缺陷型培养基观察其生长情况。*OsERF7* 和 *OsERF65* 分别作为转录抑制和转录激活对照^[26, 35]。

1.9 水稻原生质体转录活性鉴定

将 *OsERF93* 基因的 CDS 序列克隆入含有 35S 启动子的 GAL4DB 载体中, 构建效应子质粒, 与 4 $\times$ UAS-LUC 载体同时转化入水稻原生质体中, 35S 启动子驱动 *Renilla*(REN)表达的载体作为内参。实验操作依据双荧光素酶报告基因检测试剂盒(碧云天, 产品编号 RG027)的说明书进行。通过计算 LUC 荧光素酶与 REN 荧光素酶活性的比值分析 *OsERF93* 的转录活性。

1.10 纹枯病抗性鉴定

1.10.1 纹枯病病原菌培养

将从培养基中分离的 *R. solani* 菌块接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)上, 在 28 $^{\circ}$ C 条件下培养 2~3 d, 直至菌丝覆盖整个培养皿表面。随后, 使用灭菌的打孔器从培养皿中取出特定大小的菌块, 并将其放置于预先铺有一层无菌木皮块(尺寸为 0.8 mm $\times$ 2 mm $\times$ 10 mm)的培养皿中(培养皿直径为 60 mm)。随后, 向培养皿中加入 1 mL 马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB), 并在 28 $^{\circ}$ C 条件下继续培养 2~3 d, 直至木皮块表面覆盖一层菌丝。培养结束后, 将附着有菌丝的木皮块从培养皿中分离并进行纹枯病菌接种实验。

1.10.2 水稻离体茎秆抗性鉴定

对孕穗早期的水稻茎秆进行接种实验^[36], 操作方法如下: 取 10 至 15 根处于孕穗早期的茎秆, 并将剑叶及倒二叶修剪至保留 2 cm 左右并保留下部茎节; 将带有菌丝的木皮块小心地插入倒数第二叶

的叶鞘内,并将叶鞘恢复原位,避免造成机械损伤;随后,将接种完毕的茎秆插入保水性良好的花泥中,并维持适宜的温度和湿度条件,温度控制在 28~30 °C,湿度保持在 80%~85%。接种 6 d 后,对病斑的长度进行测量和记录。

1.10.3 温室活体材料抗性鉴定

在水稻苗期时将水稻移栽至特制的长条形盆中,每盆种植 5~6 株水稻,并将其置于田间进行标准的水肥管理。当水稻生长至孕穗期,将这些长条盆转移至温室环境。使用附着有立枯丝核菌菌丝の木皮块,对水稻倒三叶的叶鞘进行接种。对于每株供试植株,选择三个生长状况相似的茎秆进行接种。在接种后 14 d,对接种植株的纹枯病发病情况进行调查^[36]。

1.11 激素和病程相关基因的诱导表达检测

对孕穗期的 *OsERF93* 基因转基因材料及野生型 XD3 水稻接种纹枯病菌,并取接种后 0 h、24 h 和 48 h 的叶鞘样本,所有样本均迅速投入液氮中冷冻保存。在液氮中磨碎并提取 RNA,反转录后通过 qPCR 检测相关基因的表达情况。

1.12 农艺性状考察

田间考察 *OsERF93* 转基因材料与野生型 XD3 的农艺性状。每个株系 3 次重复,每重复 3 行,每行 12 株。种植密度和田间管理条件与上述纹枯病抗性鉴定实验一致。在水稻生长至完熟期时,测量各重复中间行中间 10 株的农艺性状,主要包括株高、穗长、分蘖数、每穗粒数以及枝梗数等性状。

1.13 数据分析

数据处理与分析工作采用 Microsoft Excel 2019 软件进行;系统发育树的构建与可视化则采用 MEGA 11 软件完成;图形制作通过 GraphPad Prism 9.5 软件实现。

2 结果与分析

2.1 *OsERF* 基因家族分析

在本实验室的前期研究中,我们采用水稻全基因组表达谱芯片技术,对纹枯病菌接种后的水稻基因诱导表达模式进行了研究,发现 *OsERF93*、*OsERF7*、*OsERF65*、*OsERF83*、*OsERF86*、*OsERF91* 和 *OsERF136* 等基因在抗感材料中受到纹枯病菌感染不同程度的诱导表达,并关注到 *OsERF93* 差异表达极显著^[26]。本研究通过对 ERF 亚家族的系统发育树分析,按照 Nakano 等^[10]的分组方法,将水

稻 ERF 家族基因分为 14 组(Group I-XIV),我们发现 *OsERF93* 与 *OsERF83*、*OsERF86*、*OsERF91*、*OsERF136* 之间存在较高的同源性(图 1-A)。我们对上述的几个同源性较高的 ERF 基因进行蛋白序列比对,发现这些基因都含有保守的 AP2/ERF 蛋白结构域,亲缘关系最近的几个基因均具有相同的结构域(图 1-B)。

2.2 *OsERF93* 受纹枯病菌侵染诱导表达

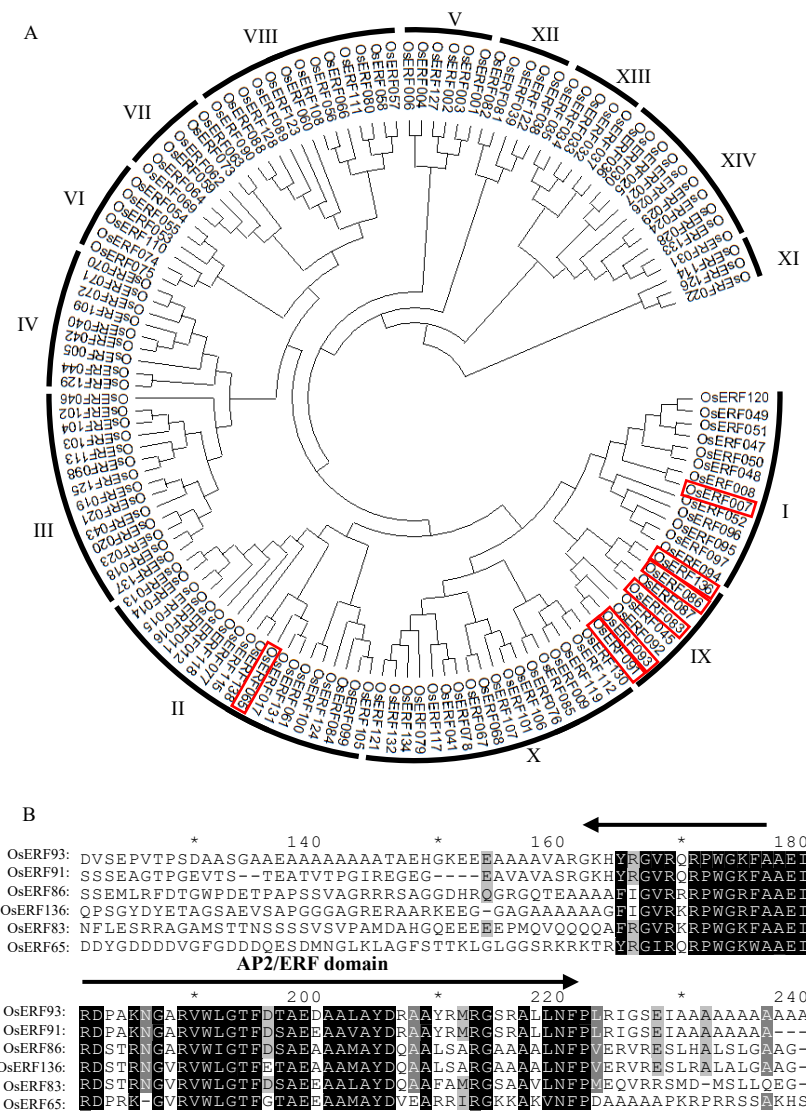
利用抽穗期的 NIP 材料,我们分析了 *OsERF93* 基因的组织表达模式。结果显示,*OsERF93* 在水稻的茎秆、叶片和叶鞘中的表达量较高,而在根部和穗部的表达量较低(图 2-A),这与纹枯病主要发生部位一致。此外,我们还对 XD3 品种喷施了 0.05% 的乙烯利(ETH)和 0.5% 的氨基氧乙酸(AOA),结果显示氨基氧乙酸能够促使 *OsERF93* 基因的表达上调,而乙烯利则会抑制 *OsERF93* 基因的表达(图 2-B),这一结果表明乙烯可以抑制 *OsERF93* 基因的表达,该基因可能在乙烯信号通路中受到负反馈调节。在对抗病 YSBR1 和感病品种 Lemont 接种纹枯病后的表达模式分析中,我们发现在接种纹枯病后 *OsERF93* 基因均有上调表达的趋势,特别是在感病品种 Lemont 中,*OsERF93* 的表达上调趋势更为显著(图 2-C),而抗病品种 YSBR1 在接种 48 h 之后 *OsERF93* 基因表达量有所下调(图 2-D)。

2.3 *OsERF93* 蛋白的亚细胞定位和转录活性分析

通过水稻原生质体亚细胞定位实验,我们发现 *OsERF93* 主要定位于细胞核与细胞膜,其定位于细胞核与其转录因子发挥功能的场所相吻合(图 3-A),而其同时也定位于细胞膜上,表明其还可能具有其他生物学功能。

在前期研究中,我们证实转录因子 *OsERF65* 具有转录激活活性^[26],而 *OsERF7* 没有转录激活功能^[35]。为了研究 *OsERF93* 是否具备转录激活功能,我们将含有 *OsERF93* 基因序列的 pGBKT7 载体与 pGADT7 载体共转化至酵母,发现共转化子能在 Leu/Trp/His/Ade 缺陷型培养基中正常生长(图 3-B),与 *OsERF65* 的共转化子相似;相比之下,*OsERF7* 与 pGBKT7 空载体对照组一样,共转化子在 Leu/Trp/His/Ade 缺陷型培养基中均无法正常生长。结果表明 *OsERF93* 能够激活下游报告基因的表达,与 *OsERF65* 相同,均具有转录激活能力。

此外,我们还通过双荧光素酶报告基因实验对 *OsERF93* 的转录激活活性进行了验证。我们将 GVL4-VP16 和 GVL4-*OsERF93*-VP16 构建在 35S



A: *ERF* 基因家族系统发育树分析, 红框标注的基因在纹枯病菌接种后的抗感材料中表现出差异性表达; B: 参与响应纹枯病诱导的 *ERF* 家族基因的相关蛋白序列比对。

A, Phylogenetic tree analysis of the *ERFs* gene family, with the genes highlighted in red boxes showing differential expression in resistant and susceptible materials after inoculation with *R. Solani*; B, Alignment of protein sequence of *ERF* family genes involved in sheath blight response.

图 1 水稻中的 *OsERF* 基因家族聚类分析与 *OsERF93* 所在亚家族蛋白序列比对

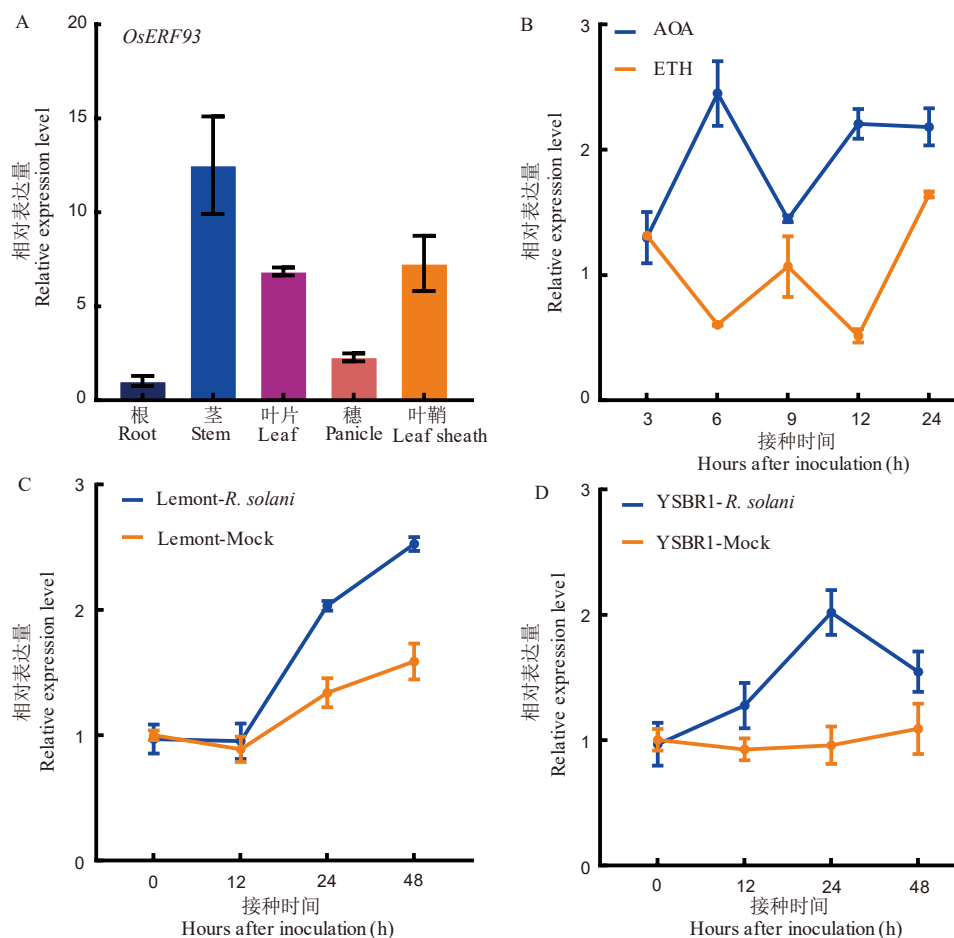
Fig. 1. Phylogenetic analysis of rice *OsERFs* gene family and protein sequence alignment of subfamily containing *OsERF93*

启动子驱动表达的载体上, 并将其与 4×UAS-LUC 报告基因载体共转化至水稻原生质体, 以 35S::REN 作为对照。结果显示, 与对照 GVL4-VP16 相比, GVL4-*OsERF93*-VP16 的 LUC/REN 活性更高, 进一步证明 *OsERF93* 在水稻中具有转录激活功能(图 3-C)。

2.4 *OsERF93* 过表达和敲除材料的分子鉴定

通过转基因策略, 我们分别创建了 *OsERF93* 基因的过表达和敲除材料, 为了检测过表达系中 *OsERF93* 基因的表达水平, 我们采用 RT-qPCR 检测分析了两个 T₂ 代过表达家系中 *OsERF93* 的表达水平, 结果显示两个独立转基因系中的 *OsERF93* 均

明显超量表达(图 4-A)。同时我们对获得的基因敲除系进行测序分析, 鉴定出两种不同序列变异的敲除突变体(图 4-C)。我们进一步开发了检测这两个敲除突变体的特异 CAPS 标记: 野生型 *OsERF93* 基因在插入突变位置处存在一个限制性内切酶 *Rsa* I 的识别基序“GTAC”, 而敲除突变体不能被该内切酶识别切割。对突变后的序列编码氨基酸进行分析, 发现 *osery93-1* 中的碱基插入改变了该插入点后的所有氨基酸编码序列, 而 *osery93-2* 中的碱基插入造成一个终止密码子的形成, 导致 *OsERF93* 基因的转录提前终止(图 4-E)。



A: *OsERF93* 组织特异性表达; B: *OsERF93* 对 ETH 和 AOA 的不同响应; C: 感病品种 Lemont 接种纹枯病菌后相对表达量变化; D: 抗病品种 YSBR1 接种纹枯病菌后相对表达量变化。图中 *R. solani* 为实验组, Mock 为对照组。

A, Tissue-specific expression of *OsERF93*; B, Differential response of *OsERF93* to ETH (Ethylene) and AOA (Aminocyclopropane-1-carboxylic acid); C, Relative expression levels of the susceptible variety Lemont after inoculation with sheath blight pathogen; D, Relative expression levels of the resistant variety YSBR1 after inoculation with sheath blight pathogen. In the figures, *R. solani* represents the treatment group, and Mock represents the control group.

图 2 *OsERF93* 诱导表达模式分析

Fig. 2. Analysis of *OsERF93* expression pattern

2.5 *OsERF93* 转基因系的纹枯病抗性鉴定

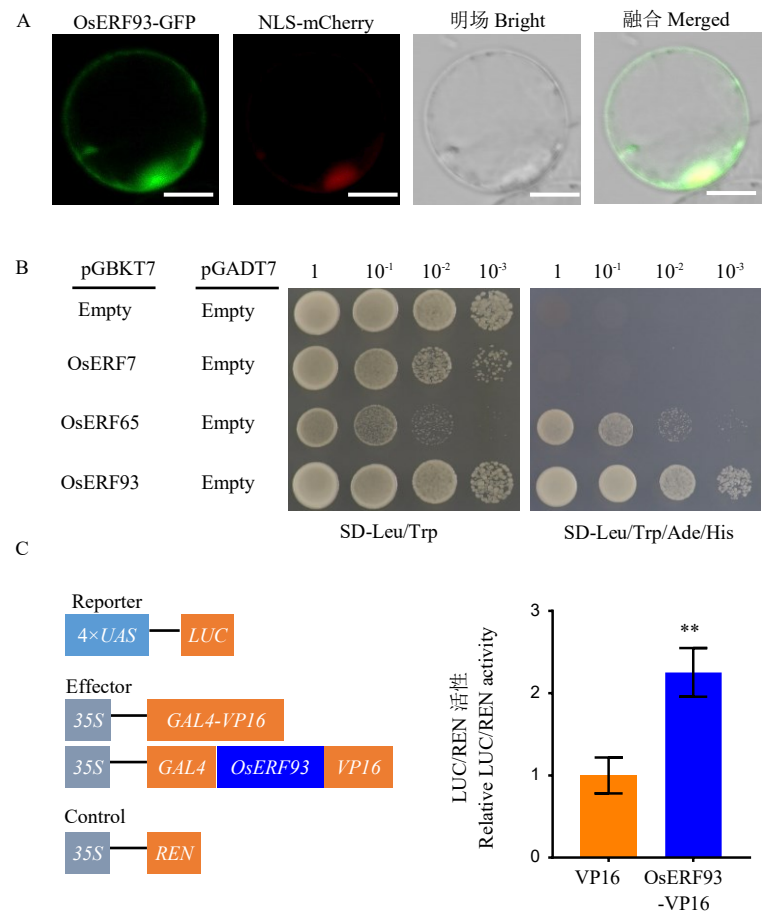
为了探究 *OsERF93* 基因对水稻纹枯病抗性的影响, 本研究在水稻孕穗期对 XD3 背景的 *OsERF93* 过表达系和敲除系分别进行了离体茎秆纹枯病菌接种鉴定(图 5-A 和图 5-B)。结果显示, 在接种后第 5 天, 与对照 XD3 的纹枯病病斑长度 (8.07 ± 1.17 cm) 相比, 两个 *OsERF93* 过表达系的病斑长度分别为 5.50 ± 1.04 cm 和 5.57 ± 1.38 cm, 而两个敲除系的病斑则分别达到了 11.64 ± 1.93 cm 和 10.92 ± 1.62 cm, 这表明 *OsERF93* 基因的过表达能够增强水稻对纹枯病的抗性, 而敲除会降低水稻的纹枯病抗性。

进一步在温室对成株期植株进行纹枯病菌接种鉴定(图 5-C 和图 5-D), 发现接种两周后, 过表达系的病斑长度分别为 15.57 ± 1.62 cm 和 14.14 ± 2.34

cm, 与野生型对照的 19.29 ± 2.87 cm 相比, 差异均达到了极显著水平; 相比之下, *OsERF93* 基因敲除系的病斑长度分别为 25.00 ± 3.42 cm 和 23.57 ± 1.81 cm, 显著长于野生型对照。结果进一步表明 *OsERF93* 基因正调控水稻对纹枯病的抗性。

2.6 *OsERF93* 调控水稻纹枯病抗性的可能信号途径分析

为了分析 *OsERF93* 基因调控水稻纹枯病抗性的可能信号机制, 我们对 *OsERF93* 转基因系中的茉莉酸、水杨酸合成信号通路以及部分病程相关蛋白(PR)基因进行了表达分析。结果发现茉莉酸合成关键基因 *OsAOS2* 在过表达系中显著诱导表达, 而在敲除系中则受到显著抑制(图 6-A); 相反, 水杨酸信号途径中的标志基因 *OsPAL1* 在其相关转基因系及对照间差异不显著(图 6-B); 乙烯信号相关基



A: *OsERF93* 在水稻细胞中的亚细胞定位, 标尺=10 μm, NLS 为细胞核定位信号; B: 酵母双杂交实验验证转录激活活性; C: 水稻原生质体瞬时转化, *VP16* 是转录激活对照。**表示由 $P < 0.01$ 的 t 检验确定的极显著差异。

A, Subcellular localization of *OsERF93* in rice cells (bar=10 μm), and NLS denoting the nuclear localization signal; B, Transcriptional activation activity verified by yeast two-hybrid assay; C, Transient transformation of rice protoplasts, with *VP16* serving as the transcriptional activation control. ** indicates a highly significant difference as determined by a t -test with $P < 0.01$.

图3 *OsERF93* 转录激活活性与亚细胞定位分析

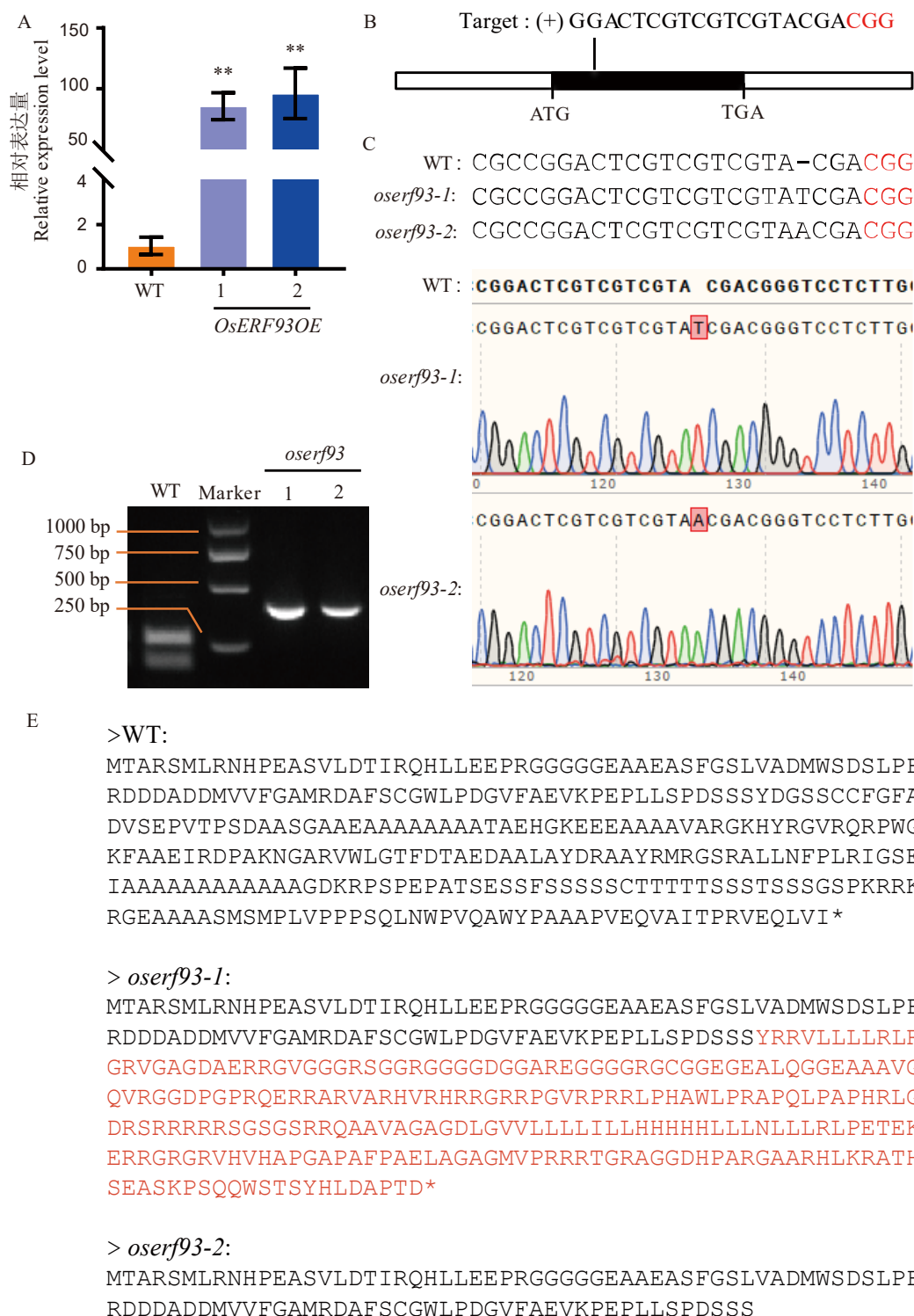
Fig. 3. Analysis of transcriptional activation activity and subcellular localization of *OsERF93*

因 *OsACO1* 和 *OsACSI* 的表达量变化与 *OsERF93* 间无明显相关(图 6-C 和图 6-D)。结果表明 *OsERF93* 可能通过激活茉莉酸合成信号途径进而正调控水稻的纹枯病抗性。我们发现 *OsPBZ1* 和 *OsPRIa* 基因在纹枯病菌接种后上调表达, 表达量分别在接种后 24 h 和 48 h 达到峰值, 且其在 *OsERF93* 过表达系中诱导表达水平显著高于野生型对照, 而在 *oserf93* 系中的表达量显著低于野生型对照(图 6-E 和图 6-F)。综上所述, *OsERF93* 过表达增强纹枯病抗性最可能与激活茉莉酸信号途径进而显著诱导部分下游 *PR* 基因表达有关。

2.7 *OsERF93* 转基因系的农艺性状

为了探究 *OsERF93* 的表达量改变是否影响水稻的农艺性状, 我们初步考察了 *OsERF93* 相关转基因系的株高、分蘖数、剑叶形状和穗型等。与野

生型相比, *OsERF93* 过表达系的株高显著降低 7.0~8.3 cm, 而 *OsERF93* 敲除系的株高无显著变化; 在分蘖数上, *OsERF93* 过表达系、敲除系及对照间均无显著差异。在考察的部分穗部性状上, 我们发现 *OsERF93* 敲除系与野生型对照在所有性状上均无显著差异, 而过表达系与对照仅在穗长、一次枝梗数上无显著差异; 在二次枝梗数、穗粒数和千粒重上, 过表达系与对照间均存在显著差异, 其中过表达系的二次枝梗数和穗粒数分别显著高于对照 6.95~8.07 个和 32~39 粒, 千粒重则显著低于对照 9.42%~11.67%。这些结果表明, *OsERF93* 基因过表达可导致株高和千粒重降低, 但会增加二次枝梗数和穗粒数, 而敲除则基本不影响水稻主要农艺和产量性状(图 7)。

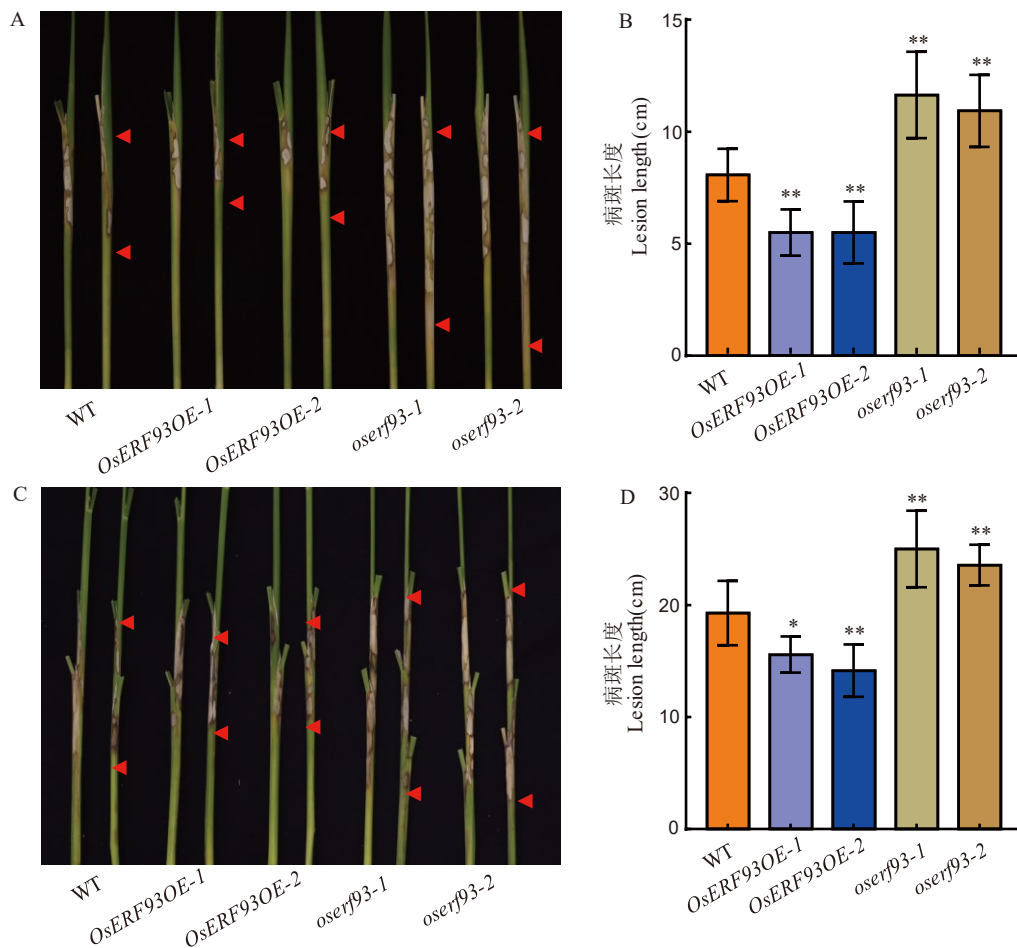


A: 两个 *OsERF93* 过表达株系中 *OsERF93* 的转录水平; B: *OsERF93* 基因结构和 CRISPR/Cas9 靶点示意图; C: 鉴定出的两个纯合 *os erf93* 突变体与野生型对照的 DNA 序列比对; D: CAPS 标记验证 *os erf93* 突变体与野生型, 引物序列见附表 1, *os erf93-1* 和 *os erf93-2* 片段长度为 417 bp, 野生型被酶切后片段长度分别为 248 bp 和 169 bp; E: 野生型及两个敲除系中 *OsERF93* 基因编码的氨基酸序列分析。

A, Transcript levels of *OsERF93* in two *OsERF93* overexpression lines; B, Schematic diagram of *OsERF93* gene structure and CRISPR/Cas9 target sites; C, DNA sequence alignment of the identified homozygous *os erf93* mutants with the wild-type control; D, CAPS marker validation of *os erf93* mutants and wild-type, with primer sequences listed in Table S1, showing fragment lengths of 417 bp for *os erf93-1* and *os erf93-2*, and the wild-type fragments being 248 bp and 169 bp after enzyme digestion; E, Amino acid sequence analysis of the *OsERF93* gene encoded in the wild-type and two knockout lines.

图 4 *OsERF93* 基因过表达系和敲除突变体的分子鉴定

Fig. 4. Relative expression levels of the *OsERF93* overexpression lines



A 和 B 分别为离体茎秆接种鉴定中对照及 *OsERF93* 相关转基因系接种后 5 d 的表型照片和病斑长度统计比较; C 和 D 分别为温室成株期植株接种鉴定中 *OsERF93* 相关转基因系接种后 14 d 的结果和病斑长度。**和*分别表示 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 统计显著性差异水平。

A and B respectively present the phenotypic photographs and statistical comparisons of lesion lengths at 5 days post-inoculation in the control and *OsERF93*-related transgenic lines during the *in vitro* stem inoculation assay; C and D respectively display the phenotypic photographs and statistical comparisons of lesion heights at 14 days post-inoculation in the *OsERF93*-related transgenic lines during the greenhouse adult plant inoculation assay. ** and * indicate statistical significance levels of $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively.

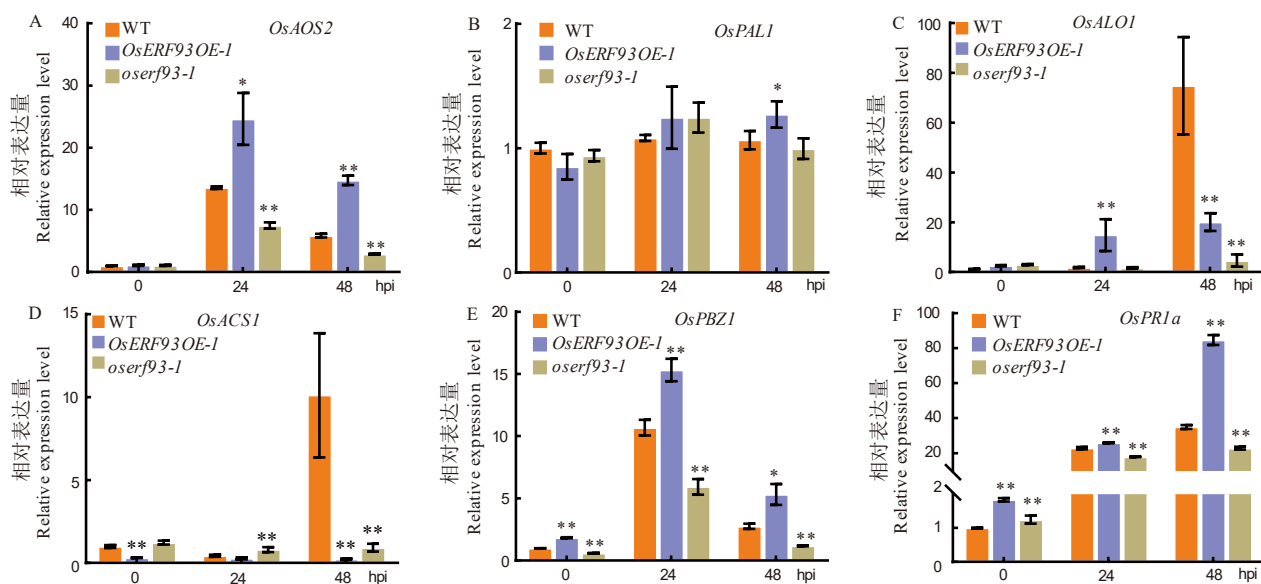
图 5 *OsERF93* 超表达和敲除系的纹枯病抗性鉴定

Fig. 5. Resistance evaluation of *OsERF93* overexpression and knock-out lines to sheath blight disease

3 讨论

在当前的水稻生产中, 针对纹枯病的防治主要依赖化学农药, 大量重复用药无疑会严重影响生态环境, 阻碍水稻绿色生产^[37-39]。利用抗病基因, 培育具有抗纹枯病特性的水稻品种是防控纹枯病最经济有效的措施。因此, 挖掘纹枯病抗性相关基因、解析其抗病分子机制具有重要的理论价值和实践意义。目前, 国内外已广泛报道了一批纹枯病抗性相关基因, 并初步发现水稻与纹枯病菌之间在胞外、胞内多个层面上发生相互作用^[40, 41]。多个研究发现 ERF 家族基因在调控水稻纹枯病抗性中可能

具有重要作用^[42]。Xie 等^[26]发现 *OsERF65* 基因负调控水稻对纹枯病的抗性, 在纹枯病菌侵染过程中, *OsERF65* 基因被显著诱导表达, 进而可直接结合活性氧清除系统中的多个关键酶基因启动子并抑制其表达, 造成活性氧适量积累, 加速细胞死亡, 从而有利于腐生性病原菌——纹枯病菌的侵染。最近, Xie 等^[35]发现 *OsERF7* 负调控水稻的纹枯病抗性, 在纹枯病菌侵染过程中, *OsERF7* 可通过抑制寄主植保素合成相关基因表达, 从而降低了水稻的纹枯病抗性。有意思的是, 本研究中我们发现 *OsERF93* 正调控水稻对纹枯病的抗性, 与 *OsERF65* 相同, *OsERF93* 也具有转录激活功能(图 3); 进一步发现, *OsERF93* 超表达系中茉莉酸合成关键基因



A 和 B 分别为茉莉酸合成基因 *OsAOS2*、水杨酸途径标志基因 *OsPAL1* 在野生型对照及 *OsERF93* 相关转基因系接种纹枯病菌后的表达量变化; C 和 D 是乙烯信号相关基因 *OsACO1* 和 *OsACS1* 在野生型和 *OsERF93* 相关转基因系接种纹枯病菌前后的表达量变化; E 和 F 分别为病程相关蛋白基因 *OsPBZ1* 和 *OsPRIa* 在野生型及 *OsERF93* 相关转基因系接种纹枯病菌后的表达量变化。 **和*分别表示 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 统计显著性差异水平。

A and B respectively depict the expression level changes of the jasmonic acid signal related gene *OsAOS2* and the salicylic acid pathway marker gene *OsPAL1* in the wild-type control and *OsERF93*-related transgenic lines after inoculation with the sheath blight pathogen; C and D represent the expression changes of ethylene signal related genes *OsACO1* and *OsACS1* in wild-type and *OsERF93*-related transgenic lines after inoculation with the sheath blight pathogen; E and F respectively show the expression level changes of the pathogenesis-related protein genes *OsPBZ1* and *OsPRIa* in the wild-type and *OsERF93*-related transgenic lines after inoculation with the sheath blight pathogen. ** and * denote statistical significance levels of $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively.

图6 *OsERF93* 超表达和敲除系中部分抗病相关基因在病原菌接种前后的表达变化特征

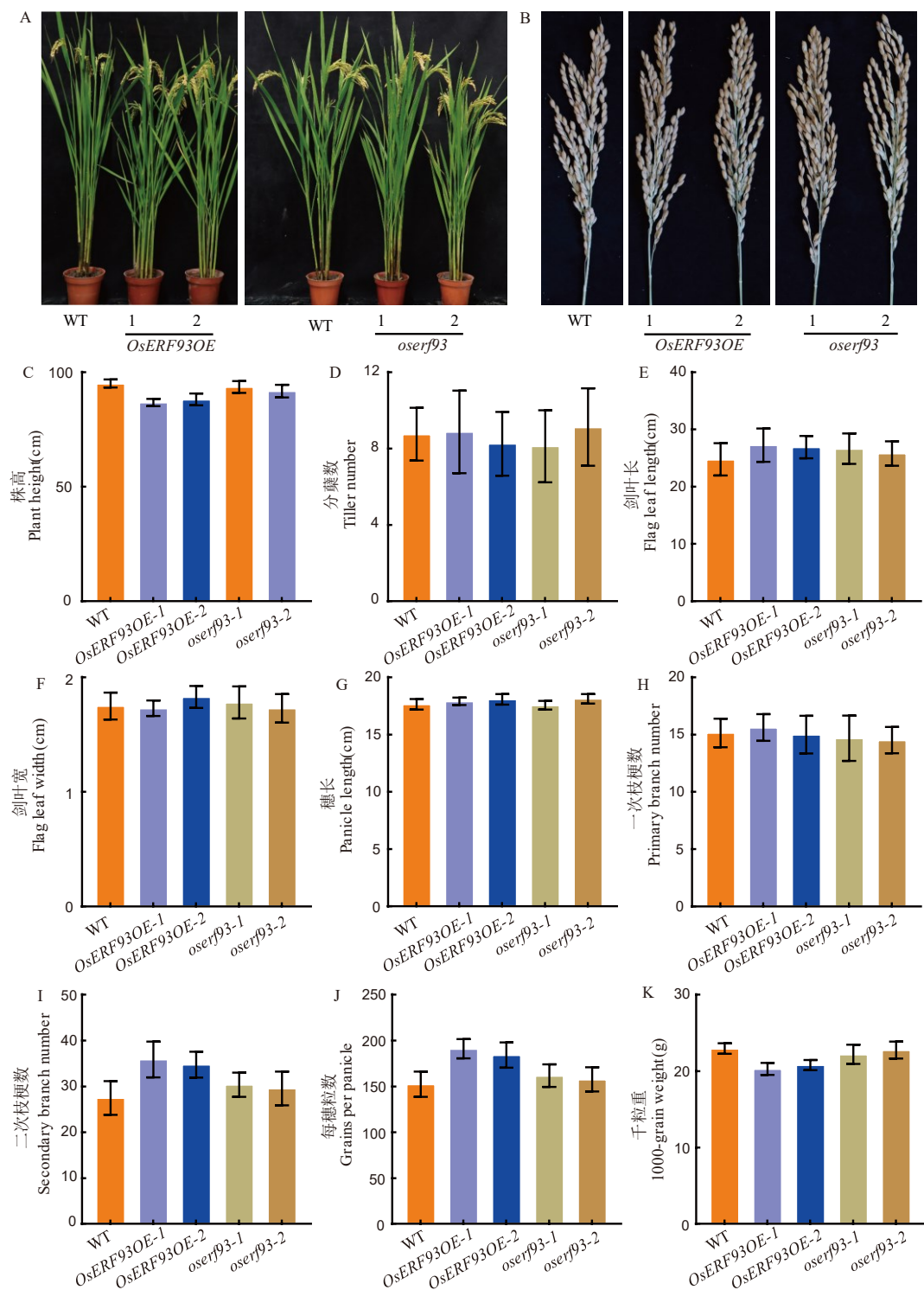
Fig. 6. Expression changes of pathogenesis-related genes in *OsERF93* overexpression and knock-out lines after inoculation with sheath blight fungus

OsAOS2 的表达得到了明显提升, 而水杨酸信号和乙烯信号相关基因在相关转基因系材料间无明显规律, 这表明激活茉莉酸介导的防御信号途径可能是 *OsERF93* 超表达增强纹枯病抗性的主要原因。本研究还发现, 超表达 *OsERF93* 会导致 *OsPRIa* 和 *OsPBZ1* 基因的高表达, 然而, *OsERF93* 究竟是如何激活这些基因包括 *OsAOS2* 表达的调控机制目前还不得而知。

已有研究表明, ERF 家族转录因子通常通过其 AP2 结构域与顺式作用元件结合, 调控下游基因的表达^[43]。Wang 等^[44]的研究表明, *VqERF* 基因能够特异性结合至茉莉酸响应基因的启动子区域, 从而激活或抑制其转录。据此推测, *OsERF93* 可能通过类似的分子机制参与茉莉酸信号通路中的基因表达调控。茉莉酸、水杨酸、乙烯和赤霉素等植物激素在植物防御反应中相互协作或拮抗, 共同构成了一个高度复杂的调控网络^[45]。在水稻病害抗性研究中, 茉莉酸信号与水杨酸信号通常表现为拮抗关系, 而茉莉酸信号与乙烯信号则多为协同作用^[45]。我们发现, *OsERF93* 基因并未激活乙烯和水杨酸通

路, 这表明该基因直接与茉莉酸合成的关键调控因子发生互作, 而可能不通过其他途径, 当然, 至于其是否还参与更广泛的激素调控网络, 目前还不得而知, 有待进一步研究。

在 ERF 家族的系统分类研究中, Nakano 等^[10]基于基因结构域的差异性, 将水稻的 ERF 家族成员划分为 15 个亚组(Group I - Group XIV 以及 Group VI-L)。通过系统发育分析, 本研究所构建的系统发育树与 Nakano 的分类结果在 Group I 至 Group VII 之间具有较高的拓扑结构相似性, 而在 Group VIII 至 Group XIV 之间则表现出显著的分类差异。这可能是由于 Nakano 主要基于基因结构域的相似性进行分类, 而本研究的系统发育树分析中还结合了基因表达模式和功能注释进而导致细微差异。但这一差异并不影响对 *OsERF93* 的功能推断, 其在 Nakano 等^[10]和本研究中均被分为一大类组, 其中 *OsERF93* 与 *OsERF91* 和 *OsERF92* 最接近。Takeuchi 等^[25]发现 *OsERF93(ERF1)* 能够促进 *OsPRI10* 基因的表达, 从而增强水稻根系在干旱条件下的生存能力。Liu 等^[46]研究发现, *OsERF92(OsERF922)* 能够抑制水



A 和 B 分别为野生型(WT)、*OsERF93* 过表达系 (*OsERF93OE-1*、*OsERF93OE-2*) 及敲除系 (*oserf93-1*、*oserf93-2*) 的株型和穗型照片比较; C-K 分别为野生型(WT)、*OsERF93* 过表达系及敲除系在株高 (C)、分蘖数 (D)、剑叶长 (E)、剑叶宽 (F)、穗长 (G)、一次枝梗数 (H)、二次枝梗数 (I)、穗粒数 (J) 和千粒重 (K) 性状上的差异统计比较; **和*分别表示 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 统计显著性差异水平。

A and B show comparisons of plant architecture and panicle morphology between the wild-type (WT), *OsERF93* overexpression lines (*OsERF93OE-1*, *OsERF93OE-2*), and knockout lines (*oserf93-1*, *oserf93-2*). C-K present statistical comparisons of differences between the wild-type(WT), *OsERF93* overexpression lines, and knockout lines for traits including plant height (C), tiller number (D), flag leaf length (E), flag leaf width (F), panicle length (G), primary branch number (H), secondary branch number (I), grain number per panicle (J), and 1000-grain weight (K). ** and * indicate statistically significant differences at $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively.

图 7 *OsERF93* 相关转基因系及其野生型间的部分农艺性状比较

Fig. 7. Comparison of some agronomic traits among WT, *OsERF93* overexpression and knock-out transgenic lines

稻抗病相关基因的表达,并负调控稻瘟病抗性和水稻耐盐性。Hong 等^[47]的研究显示, *OsERF91* (*OsBIERF3*)正调控水稻对稻瘟病和白叶枯病的抗性,但可能会降低水稻的耐寒性。本研究通过对水稻中的 ERF 亚家族的系统发育树进行了分析,发现 *OsERF93* 与 *OsERF83*、*OsERF86*、*OsERF91*、*OsERF136* 之间存在较高的同源性(图 1-A),而与 *OsERF65* 和 *OsERF7* 均不在一个亚分支内。尽管 *OsERF93* 与 *OsERF65*、*OsERF7* 具有相同的 AP2/ERF 结构域,但其 N 端和 C 端序列存在较大差异,这可能导致这些基因通过不同的信号通路对水稻纹枯病抗性产生不同的调控作用。具体而言, *OsERF93* 通过茉莉酸途径增强水稻的纹枯病抗性,而 *OsERF65* 和 *OsERF7* 则通过活性氧积累降低抗性。这一结果暗示,不同亚家族分支内的 *OsERF* 基因在调控抗病性功能上可能存在显著的多样性,而这种多样性可能源于保守结构域框架下的微小序列变化。因此,深入研究不同 *OsERF* 基因的功能有利于揭示这种保守与变异并存的差异机制,为进一步解析植物转录因子功能演化提供了重要依据。

本研究还对 *OsERF93* 超表达系和敲除系部分农艺性状进行了初步调查分析,发现相比野生型对照, *OsERF93* 过表达可适当降低植株株高和千粒重,但是对分蘖数、剑叶长、剑叶宽、穗长、一次枝梗数无影响;但是有意思的是, *OsERF93* 过表达系的二次枝梗数显著增加,这导致超表达系每穗粒数有了明显提高。考虑到产量是一个复杂的数量性状,除了受本研究调查的几个穗部性状影响之外,还与结实率密切相关。由于群体规模的问题,本研究未能调查各转基因材料的结实率,因此,最终对 *OsERF93* 基因过表达究竟对产量是否有影响及影响程度,均还有待进一步的大小区测定。另外,由于 *OsERF93* 增强抗病性的信号机制可能具有广谱性特征,因此,后续还有必要鉴定 *OsERF93* 过表达系是否对其他主要水稻病害具有广谱抗性。

在线辅助性信息:附表 1 请见《中国水稻科学》网站(<http://www.ricesci.cn>)。

参考文献:

- [1] Kumar K V K, Reddy M S, Kloepper J W, Lawrence K S, Groth D E, Miller M E. Sheath blight disease of rice (*Oryza sativa* L.): An overview[J]. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 2016, 6(2): 465-480.
- [2] Nasimi Z, Barriuso J, Keshavarz T, Zheng A. Molecular, physiological, and biochemical properties of Sclerotia metamorphosis in *Rhizoctonia solani*[J]. *Fungal Biology Reviews*, 2024, 48: 100351.
- [3] 王爱军, 王娜, 顾思思, 赵文娟, 李平, 郑爱萍. 我国水稻纹枯病菌的融合类群及致病性差异[J]. *草业学报*, 2018, 27 (7): 55-63.
Wang A J, Wang N, Gu S S, Zhao W J, Li P, Zheng A P. The fusion groups and pathogenicity differences of rice sheath blight pathogen in China[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2018, 27(7): 55-63. (in Chinese with English abstract)
- [4] Wu W, Huang J, Cui K, Nie L, Wang Q, Yang F, Shah F, Yao F, Peng S. Sheath blight reduces stem breaking resistance and increases lodging susceptibility of rice plants[J]. *Field Crops Research*, 2012, 128: 101-108.
- [5] 姜伟. 水稻纹枯病对产量和抗倒性的影响研究与抗病分子改良[D]. 扬州: 扬州大学, 2015.
Jiang W. Study on the effects of rice sheath blight on yield and lodging resistance, and molecular breeding for disease resistance [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2015. (in Chinese with English abstract)
- [6] 陈海霞, 朱明芬, 常晓丽. 4 种杀菌剂防治水稻纹枯病效果研究[J]. *上海农业学报*, 2019, 35(2): 52-55.
Chen H X, Zhu M F, Chang X L. Study on the effect of four fungicides on sheath blight of rice[J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2019, 35(2): 52-55. (in Chinese with English abstract)
- [7] 袁筱萍, 魏兴华, 余汉勇, 王一平, 汤圣祥. 不同品种及有关外因对水稻纹枯病抗性的影响[J]. *作物学报*, 2004, 30(8): 768-773.
Yuan X P, Wei X H, Yu H Y, Wang Y P, Tang S X. Influence of different varieties and related external factors on the resistance of rice to sheath blight[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2004, 30(8): 768-773. (in Chinese with English abstract)
- [8] 桑海旭, 王井士, 刘郁, 李运动, 马晓慧, 刘志恒. 水稻纹枯病对水稻产量及米质的影响[J]. *北方水稻*, 2013(1): 10-13.
Sang H X, Wang J S, Liu Y, Li Y D, Ma X H, Liu Z H. The impact of rice sheath blight on rice yield and rice quality[J]. *Northern Rice*, 2013(1): 10-13. (in Chinese with English abstract)
- [9] 秦息林. 水稻纹枯病对水稻产量的影响[J]. *南方农业*, 2015, 9(3): 27-28.
Qin X L. The impact of rice sheath blight on rice yield[J]. *Southern Agriculture*, 2015, 9(3): 27-28. (in Chinese)
- [10] Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H. Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice[J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(2): 411-432.
- [11] Xie W, Ding C, Hu H, Dong G, Zhang G, Qian Q, Ren D. Molecular events of rice AP2/ERF transcription factors[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(19): 12013.

- [12] Shigyo M, Ito M. Analysis of gymnosperm two-AP2-domain-containing genes[J]. *Development Genes and Evolution*, 2004, 214(3): 105-114.
- [13] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress[J]. *The Plant Cell*, 1994, 6(2): 251-264.
- [14] Agarwal P K, Agarwal P, Reddy M K, Sopory S K. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants[J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25(12): 1263-1274.
- [15] Tezuka D, Kawamata A, Kato H, Saburi W, Mori H, Imai R. The rice ethylene response factor OsERF83 positively regulates disease resistance to *Magnaporthe oryzae*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 135: 263-271.
- [16] Feng K, Hou X L, Xing G M, Liu J X, Duan A Q, Xu Z S, Li M Y, Zhuang J, Xiong A S. Advances in AP2/ERF super-family transcription factors in plant[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2020, 40(6): 750-776.
- [17] Kitomi Y, Hidemi K, Inukai Y. Molecular mechanism of crown root initiation and the different mechanisms between crown root and radicle in rice[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, 6(9): 1276-1278.
- [18] Lee D Y, An G. Two ap2 family genes, supernumerary bract (*snb*) and OsINDETERMINATE spikelet 1 (*OsIDS1*), synergistically control inflorescence architecture and floral meristem establishment in rice[J]. *The Plant Journal*, 2012, 69(3): 445-461.
- [19] Jung H, Chung P J, Park S H, Redillas M C F R, Kim Y S, Suh J W, Kim J K. Overexpression of *OsERF48* causes regulation of *OsCML16*, a calmodulin-like protein gene that enhances root growth and drought tolerance[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(10): 1295-1308.
- [20] Zhao Y, Cheng S, Song Y, Huang Y, Zhou S, Liu X, Zhou D X. The interaction between rice ERF3 and WOX11 promotes crown root development by regulating gene expression involved in cytokinin signaling[J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(9): 2469-2483.
- [21] Lee D Y, Lee J, Moon S, Park S Y, An G. The rice heterochronic gene *SUPERNUMERARY BRACT* regulates the transition from spikelet meristem to floral meristem[J]. *The Plant Journal*, 2007, 49(1): 64-78.
- [22] Guo H, Ecker J R. The ethylene signaling pathway: New insights[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(1): 40-49.
- [23] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57: 781-803.
- [24] Tran T T, Pérez-Quintero A L, Wonni I, Carpenter S C D, Yu Y, Wang L, Leach J E, Verdier V, Cunnac S, Bogdanove A J, Koebnik R, Hutin M, Szurek B. Functional analysis of African *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* TALomes reveals a new susceptibility gene in bacterial leaf blight of rice[J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(6): e1007092.
- [25] Takeuchi K, Gyohda A, Tominaga M, Kawakatsu M, Hatakeyama A, Ishii N, Shimaya K, Nishimura T, Riemann M, Nick P, Hashimoto M, Komano T, Endo A, Okamoto T, Jikumaru Y, Kamiya Y, Terakawa T, Koshiba T. RSOsPR10 expression in response to environmental stresses is regulated antagonistically by jasmonate/ethylene and salicylic acid signaling pathways in rice roots[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2011, 52(9): 1686-1696.
- [26] Xie W, Cao W, Lu S, Zhao J, Shi X, Yue X, Wang G, Feng Z, Hu K, Chen Z, Zuo S. Knockout of transcription factor OsERF65 enhances ROS scavenging ability and confers resistance to rice sheath blight[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2023, 24(12): 1535-1551.
- [27] Zarbafi S S, Ham J H. An overview of rice QTLs associated with disease resistance to three major rice diseases: Blast, sheath blight, and bacterial panicle blight[J]. *Agronomy*, 2019, 9(4): 177.
- [28] Channamallikarjuna V, Sonah H, Prasad M, Rao G J N, Chand S, Upreti H C, Singh N K, Sharma T R. Identification of major quantitative trait loci qSBR11-1 for sheath blight resistance in rice[J]. *Molecular Breeding*, 2010, 25(1): 155-166.
- [29] Helliwell E E, Wang Q, Yang Y. Transgenic rice with inducible ethylene production exhibits broad-spectrum disease resistance to the fungal pathogens *Magnaporthe oryzae* and *Rhizoctonia Solani*[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2013, 11(1): 33-42.
- [30] Tonnessen B W, Manosalva P, Lang J M, Baraoidan M, Bordeos A, Mauleon R, Oard J, Hulbert S, Leung H, Leach J E. Rice phenylalanine ammonia-lyase gene *OsPAL4* is associated with broad spectrum disease resistance[J]. *Plant Molecular Biology*, 2015, 87(3): 273-286.
- [31] Liu Y, Liu W W, Li L, Frederic F, Wang X F. Transcriptome analysis reveals different response of resistant and susceptible rice varieties to rice stripe virus infection[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2023, 22(6): 1750-1762.
- [32] Yang X, Yan S, Li Y, Li G, Sun S, Li J, Cui Z, Huo J, Sun Y, Wang X, Liu F. Comparison of transcriptome between tolerant and susceptible rice cultivar reveals positive and negative regulators of response to *Rhizoctonia Solani* in rice[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(18): 14310.
- [33] Xue X, Cao Z X, Zhang X T, Wang Y, Zhang Y F, Chen Z X, Pan X B, Zuo S M. Overexpression of *OsOSMI* enhances resistance to rice sheath blight[J]. *Plant Disease*, 2016, 100(8): 1634-1642.
- [34] Cao W, Cao X, Zhao J, Zhang Z, Feng Z, Ouyang S, Zuo

- S. Comprehensive characteristics of microRNA expression profile conferring to sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* in rice[J]. *Rice Science*, 2020, 27(2): 101-112.
- [35] Xie Y, Xie W, Zhao J, Xue X, Cao W, Shi X, Wang Z, Wang Y, Wang G, Feng Z, Hu K, Chen X, Chen Z, Zuo S. *OsERF7* negatively regulates resistance to sheath blight disease by inhibiting phytoalexin biosynthesis[J]. *Rice Science*, 2025, 32(3): 367-379.
- [36] 贺闽, 尹俊杰, 冯志明, 朱孝波, 赵剑华, 左示敏, 陈学伟. 水稻稻瘟病和纹枯病抗性鉴定方法[J]. 植物学报, 2020, 55(5): 577-587.
- He M, Yin J J, Feng Z M, Zhu X B, Zhao J H, Zuo S M, Chen X W. Identification methods for resistance to rice blast and sheath blight in rice[J]. *Journal of Botany*, 2020, 55(5): 577-587. (in Chinese with English abstract)
- [37] 王志鹏. 水稻纹枯病的发生与防控技术[J]. 种子科技, 2022, 40 (6): 118-120.
- Wang Z P. Occurrence and control techniques of rice sheath blight[J]. *Seed Science and Technology*, 2022, 40(6): 118-120. (in Chinese)
- [38] 吴婕, 席亚东, 李洪浩, 王晓黎, 彭化贤. 四川省水稻纹枯病菌对井冈霉素抗药性监测[J]. 西南农业学报, 2015, 28 (6): 2501-2504.
- Wu J, Xi Y D, Li H H, Wang X L, Peng H X. Monitoring of resistance to Jinggangmycin in *Rhizoctonia solani* causing rice sheath blight in Sichuan Province[J]. *Journal of Southwest Agriculture*, 2015, 28(6): 2501-2504. (in Chinese with English abstract)
- [39] 吴志明, 李昆太. 水稻纹枯病的危害及其微生物防治概述[J]. 生物灾害科学, 2018, 41 (2): 81-88.
- Wu Z M, Li K T. Overview of the harm of rice sheath blight and its microbiological control[J]. *Journal of Biological Disaster Science*, 2018, 41(2): 81-88. (in Chinese with English abstract)
- [40] Huang Y, Li W, Liu T, Lin X, Xia Y, Zhu W, Cai Q. Rice extracellular vesicles send defense proteins into fungus *Rhizoctonia solani* to reduce disease[J]. *Developmental Cell*, 2025, 60(8): 1168-1181.
- [41] Cao B, Wang J, Ma J, Hai Y, Wang X, Fu Z, Xiang Z, Wang Y, Zhang L, Wang J, Li S. Large-scale screening and function analysis of *Rhizoctonia Solani* effectors targeting rice chloroplasts[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(44): 24336-24346.
- [42] Gutterson N, Reuber T L. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(4): 465-471.
- [43] 许世达, 耿兴敏, 王露露. 植物乙烯响应因子(ERF)的结构、功能及表达调控研究进展[J]. 浙江农林大学学报, 2021, 38(3): 624-633.
- Xu S D, Geng X M, Wang L L. Research progress on the structure, function, and expression regulation of plant ethylene response factors (ERF)[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2021, 38(3): 624-633. (in Chinese with English abstract)
- [44] Wang L, Liu W, Wang Y. Heterologous expression of Chinese wild grapevine VqERFs in *Arabidopsis thaliana* enhance resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and to *Botrytis cinerea*[J]. *Plant Science*, 2020, 293: 110421.
- [45] Hughes P W. OsGSK2 integrates jasmonic acid and brassinosteroid signaling in rice[J]. *The Plant Cell*, 2020, 32(9): 2669-2670.
- [46] Liu D, Chen X, Liu J, Ye J, Guo Z. The rice ERF transcription factor *OsERF922* negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(10): 3899-3911.
- [47] Hong Y, Wang H, Gao Y, Bi Y, Xiong X, Yan Y, Wang J, Li D, Song F. ERF transcription factor OsBIERF3 positively contributes to immunity against fungal and bacterial diseases but negatively regulates cold tolerance in rice[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(2): 606.