DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.01042

小麦 *TaPP2-A13* 基因的表达响应逆境胁迫并与 SCF 复合体接头蛋白 TaSKP1 相互作用

孟钰玉¹ 魏春茹¹ 范润侨¹ 于秀梅^{1,2,*} 王逍冬² 赵伟全² 魏新燕²
康振生³ 刘大群²

¹ 河北农业大学生命科学学院 / 河北省植物生理与分子病理学重点实验室, 河北保定 071001; ² 河北省农作物病虫害生物防治技术创新中心, 河北保定 071001; ³ 西北农林科技大学植物保护学院 / 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西杨凌 712100

摘要: 为探究韧皮部蛋白 2 (Phloem protein 2, PP2) 基因在小麦 (*Triticum aestivum*) 响应逆境胁迫中的功能及作用机制, 本文以小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr15 为材料获得一个小麦韧皮部蛋白 2 基因 *TaPP2-A13*。该基因编码一个由 298 个氨基酸组成的亲水性蛋白质, 相对分子量为 33.18 kD, 等电点为 6.36。其 N 端为 F-box 结构域, C 端具有典型的 PP2 结构域, 属于 F-box/PP2 (FBP) 亚家族成员。*TaPP2-A13* 与禾本科植物中 PP2-A13 蛋白的亲缘关系较近。表达模式分析表明, *TaPP2-A13* 的表达受叶锈菌 (*Puccinia triticina*) 侵染的诱导, 且感病组合中表达更强。用脱落酸 (ABA)、水杨酸 (SA) 和甲基茉莉酸 (MeJA) 处理后, *TaPP2-A13* 总体呈现上调表达趋势。利用聚乙二醇 (PEG) 和 H₂O₂ 处理后, 小麦 *TaPP2-A13* 显著下调表达, 而 NaCl 处理后 *TaPP2-A13* 呈现先上调后下调的表达趋势。亚细胞定位结果表明 *TaPP2-A13* 在细胞核和细胞质均有分布。以构建的重组载体 BD-*TaPP2-A13* 为诱饵筛选酵母文库, 获得 11 种可能与 *TaPP2-A13* 互作的蛋白, 酵母双杂交 (Yeast 2 Hybrid, Y2H) 确定其中的 5 种蛋白 *TaPP2C5*、*TaSLY1*、*TaCHI*、*TaRbcS* 和 *TaSKP1* 分别与 *TaPP2-A13* 存在相互作用。进一步利用 BiFC 和 Co-IP 确认 *TaSKP1* 与 *TaPP2-A13* 两种蛋白质之间的相互作用关系, 推测 *TaPP2-A13* 可能为 SCF 复合体成员。本研究结果为深入解析 *TaPP2-A13* 蛋白的功能, 并探究其调控网络奠定了基础。

关键词: 韧皮部蛋白 2; 小麦叶锈病; 非生物逆境; 激素; 表达模式; 蛋白互作

TaPP2-A13 gene shows induced expression pattern in wheat responses to stresses and interacts with adaptor protein SKP1 from SCF complex

MENG Yu-Yu¹, WEI Chun-Ru¹, FAN Run-Qiao¹, YU Xiu-Mei^{1,2,*}, WANG Xiao-Dong², ZHAO Wei-Quan², WEI Xin-Yan², KANG Zhen-Sheng³, and LIU Da-Qun²

¹ College of Life Sciences, Hebei Agricultural University / Hebei Key Laboratory of Plant Physiology and Molecular Pathology, Baoding 071001, Hebei, China; ² Technological Innovation Center for Biological Control of Crop Diseases and Insect Pests of Hebei Province, Baoding 071001, Hebei, China; ³ College of Plant Protection, Northwest A&F University / State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: To explore the function and molecular mechanism of Phloem protein 2 (PP2) gene in wheat (*Triticum aestivum* L.) response to stresses, a *TaPP2-A13* putatively encoding a PP2 protein was obtained from TcLr15, a wheat near isogenic line against leaf rust pathogen, in the present study. The complete coding region of *TaPP2-A13* encodes a hydrophilic polypeptide with

本研究由河北省高等学校科学技术研究项目 (ZD2019086), 河北省自然科学基金项目 (C2020204050), 国家自然科学基金项目 (31301649) 和旱区作物逆境生物学国家重点实验室开放课题基金 (CSBAKF2018008) 资助。

This study was supported by Higher Education Science and Technology Research Project of Hebei Province (ZD2019086), the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2020204050), the National Natural Science Foundation of China (31301649), and the Open Research Fund of State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas (CSBAKF2018008).

* 通信作者 (Corresponding author): 于秀梅, E-mail: yuxiumeizy@126.com

第一作者联系方式: E-mail: 183656991@qq.com

Received (收稿日期): 2020-05-12; 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.20200930.1536.004.html>

molecular weight of 33.18 kD, and theoretical isoelectric point is 6.36. There is an F-box domain at N-terminal and a PP2 domain at C-terminal of the *TaPP2-A13* protein sequence, which indicates that wheat *TaPP2-A13* belongs to F-box/PP2 (FBP) subfamily. Wheat *TaPP2-A13* shared relatively higher sequence similarity with PP2-A13 from *Gramineae*. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) results indicated that *TaPP2-A13* was induced by infection of leaf rust pathogen (*Puccinia triticina*), and showed stronger expression in susceptible combination than that in resistant one. An obvious up-regulation of *TaPP2-A13* was observed after treatment with abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA) and methyl jasmonate (MeJA) in wheat. *TaPP2-A13* was significantly down-regulated after treatment with PEG and H₂O₂, while *TaPP2-A13* striking increased first, then fell down after NaCl treatment in wheat. Subcellular localization result indicated that *TaPP2-A13* distributed in both of the nucleus and cytoplasm. The recombinant vector BD-*TaPP2-A13* was used as the bait to screen Yeast 2 Hybrid (Y2H) library, 11 kinds of proteins were finally obtained. Further Y2H assays identified that *TaPP2-A13* physically interacted with five kinds of proteins including *TaPP2C5*, *TaSLY1*, *TaCHI*, *TaRbcS*, and *TaSKP1*. BiFC and Co-IP results further confirmed that *TaPP2-A13* interacted with *TaSKP1*, an adaptor protein from SKP1-Cullin-F-box (SCF) complex, which made us to speculate that *TaPP2-A13* functions as a member of SCF complex by binding with *TaSKP1*. These findings laid some foundation for further analyzing the function of *TaPP2-A13* and exploring its regulatory network.

Keywords: phloem protein 2; wheat leaf rust; abiotic stresses; hormone; expression pattern; protein interaction

F-box 蛋白是 SCF (SKP1-Cullin-F-box) 类 E3 连接酶的重要组分。第一个 F-box 基序于 1996 年在 Cyclin F 蛋白的 N 端被发现, 并因此而得名^[1]。作为 SCF 复合体中特异性识别待降解底物的决定性蛋白, F-box 蛋白广泛地存在于植物中, 负责调控植物的生长发育、激素信号传导、自交不亲和及抵御胁迫等多个代谢过程。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) F-box 蛋白 Hawaiian skirt 和 UFO (Unusual floral organs) 均参与花发育的过程^[2-3]; 生长素受体 TIR1 和茉莉酸信号受体蛋白 COI1 (Coronatine-insensitive 1) 均由 F-box 基因编码, 能与多种蛋白形成 SCF^{TIR1} 和 SCF^{COI1}, 继而在植物生长发育及激素介导的生物/非生物逆境过程中发挥作用^[4-5]; 植物的自交亲和/不亲和和受雌蕊专化的 *S-RNase* 基因和多个花粉专化的 S-位点 *F-box* (*SLF*) 基因共同调控。矮牵牛 (*Petunia inflata*) F-box 基因 *PiSLF2* (*S-locus F-box 2*) 编码的花粉 S-决定因子可与花柱 S-决定因子发生相互识别, 从而导致配子体的自交不亲和^[6]。据报道, 目前鉴定了 17 个 *SLF* 基因, 其中至少 7 个参与花粉的专化性识别^[7]; 在烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中过表达小麦 F-box 基因 *TaFBA1* 可增强烟草的抗旱性及对热、盐和氧化胁迫的抵抗力^[8-11]; F-box 蛋白 MAX2 (More axillary 2) 不仅参与植物的发育, 而且在抵御病原细菌丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*, *P. syringae*) 和胡萝卜果胶杆菌 (*Pectobacterium carotovorum*, *P. carotovorum*) 侵染及盐和干旱胁迫过程中发挥作用^[12]; F-box 基因 *CPR30* 在拟南芥抵御病原细菌 *P. syringae* 的入侵过程中起着负调控作用^[13]; 葡萄 (*Vitis vinifera*) F-box 基因 *BIG-24.1* 不仅受灰霉病 (*Botrytis cinerea*) 的强烈诱导, 对 UV-C、伤害、SA、ABA、MeJA、乙烯等非生物胁迫和激素也反应强烈

^[14]。由此可见, F-box 家族在植物中发挥着广泛而重要的作用, 近年来对其在抗病和抗逆中的作用引起愈加广泛重视。

韧皮部为植物远距离信息传递和大分子物质的运输提供了一条有效的途径, 同时韧皮部也是植物防御病原物侵染的战略要地。韧皮部蛋白 2 (Phloem protein 2, PP2) 是存在于植物韧皮部汁液中的一种最丰富和神秘的蛋白质, 以二聚体存在, 是具有几丁质结合功能的特殊凝集素^[15]。韧皮部蛋白 AtPP2-B11 参与了拟南芥对干旱胁迫的响应, 且发挥负调控作用^[16]; 拟南芥中 PP2-A1 编码韧皮部凝集素类似蛋白, 研究发现该蛋白具有分子伴侣和抗真菌侵染的双重作用^[17]; 南瓜 (*Cucurbita maxima*) 的韧皮部分泌蛋白 PP2 可以将细菌和真菌固定在交联的细丝上, 从而封闭受伤的韧皮部筛管, 使之免受病原菌的进一步侵染^[18]; 黄龙病是柑橘 (*Citrus reticulata*) 上发生的一种世界级毁灭性病害。长春花 (*Catharanthus roseus*) 作为柑橘黄龙病的理想研究材料, 在受到黄龙病菌 (*Candidatus Liberibacter asiaticus*, CLas) 感染后, 长春花中的 PP2 类蛋白呈现强烈诱导表达, 这可能导致胼胝质沉积, 筛孔堵塞筛孔, 从而阻止病原菌的侵染^[19]; 此外, PP2 类蛋白 *CsPP2B15* 在高感 CLas 的品种锦橙 (*Citrus sinensis*) 嫩叶中受 CLas 诱导显著上调表达, 而在抗病品种酸柚 (*Citrus grandis*) 的嫩叶中受 CLas 诱导显著下调表达^[20]; 苎麻 (*Boehmeria nivea*) 中鉴定了 15 个 PP2 蛋白, 这些蛋白的编码基因在响应非生物逆境、昆虫及机械伤害的过程中呈现不同的反应^[21]。以上报道表明, 韧皮部蛋白 2 在抵御病原菌侵染, 昆虫和机械伤害及非生物胁迫中均发挥重要作用。

综上, F-box 蛋白家族尤其韧皮部蛋白 2 亚家族 (F-box/PP2, FBP) 在植物抵御病原菌侵染和非生物胁迫过程中发挥了重要的调节作用。FBP 成员在小麦中的功能如何, 是否参与小麦抵御生物及非生物胁迫过程, 目前尚未见报道。鉴于此, 本研究以小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr15 为材料, 在获得小麦 *TaPP2-A13* 基因全长编码区的基础上, 借助生物信息学分析、qRT-PCR、亚细胞定位、酵母双杂交 (Yeast 2 Hybrid, Y2H)、双分子荧光互补 (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC) 和免疫共沉淀 (Co-Immunoprecipitation, Co-IP) 等技术, 明确该基因在逆境胁迫下的表达模式, 确定其亚细胞定位, 并获得与之互作的蛋白。研究结果将拓宽小麦中 F-box 家族基因的功能认识, 为深入解析 *TaPP2-A13* 在小麦抵御生物和非生物胁迫中的作用机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 小麦和叶锈菌材料及处理方法

小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr15、小麦高感叶锈病品种郑州 5389、供试叶锈菌株 05-19-43 和 05-5-137 均由河北省农作物病虫害生物防治技术创新中心提供。

郑州 5389 用于扩繁叶锈菌株 05-19-43 和

05-5-137 的夏孢子, 方法参照 Kolmer^[22]进行。小麦 TcLr15 幼苗分别进行叶锈菌 (05-19-43 和 05-5-137) 侵染、激素 (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ABA、200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ MeJA 和 2 mmol L^{-1} SA) 和非生物逆境 (10% PEG、7 mmol L^{-1} H_2O_2 和 300 mmol L^{-1} NaCl) 处理, 取样时间及处理方法同于孟钰玉等^[23]的方法。

1.2 *TaPP2-A13* 基因全长扩增

以小麦 TcLr15 一叶一心期的叶片 cDNA 作为 PCR 扩增的模板。自小麦转录组数据库 ExpVIP (wheat expression browser, <http://www.wheat-expression.com/>) 中挖掘到 1 条基因 (TraesCS2D02G397700), 该基因与粗山羊草 *AetPP2-A13-like* 基因 (GenBank 登录号为 XM_020331589.1) 同源性高达 100%, 以此序列作为引物设计的模板, 设计克隆引物 *TaPP2-A13-F* 和 *TaPP2-A13-R* (表 1)。PCR 反应总体积 20 μL : cDNA 模板 1.0 μL 、上、下游引物 (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) 各 0.5 μL 、2 $\times$ Es Taq Master Mix 10 μL 、ddH₂O 8 μL 。PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 33 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。扩增获得的目的片段与 pMD19-T 载体连接, 构建 pMD19-T-*TaPP2-A13* 质粒, 然后将其转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。菌落 PCR 鉴定为阳性的克隆送至北京中科希林生物科技有限责任公司进行序列测定。

表 1 本实验中涉及的引物信息

Table 1 Primer information used in this study

引物名称 Primer name	上游引物序列 Forward primer sequence (5'-3')	下游引物序列 Reverse primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature ($^{\circ}\text{C}$)
<i>TaPP2-A13-F/R</i>	AATGGCGGAATCCCTCGTG	CGGGTTTGGACAAGAATGG	58.0
<i>TaPP2-A13-qPCR-F/R</i>	ATCGATGATCGGCGGTATTG	AGTGGAGCCGGAAGAGAAGG	59.5
<i>TaGAPDH-qPCR-F/R</i>	CTGCCTTGCTCCTCTTGCTAA	CTTGATGGAAGGACCAGCAAC	59.5
<i>TaPP2-A13-His-F/R</i>	gctgatatcgatccgaatcATGGGGGC GGGGGCTTCG	tgcggccgaagcttgacTTACTTGCGTATGC ACTCCTCG	60.0
<i>TaPP2-A13-GFP-F/R</i>	atacaccaaatcgactctagaATGGGGGC GGGGGCTTCG	catggtaccggatccactagtCTTGCGTATGCACT CCTCGG	60.0
<i>TaPP2-A13-BD-F/R</i>	CGgaatccATGGGGGC	ggatccTTACTTGCGTATGCACT	60.0
AD-F/R	TAATACGACTCACTATAGGGCG	AGATGGTGACGATGCACAG	56.0
<i>TaPP2-A13-NE-F/R</i>	cccaggcctactagtggatccATGGGGGC GGGGGCTTCG	agcgggtaccctcgaggtcgacCTTGCGTATGCACT CCTCGG	60.0
<i>TaSKP1-FLAG-F/R</i>	gagaacacgggggactctagaATGGCGG CCGCGGGAGAC	cgctctaggttaagtctagaCTCAAAGGCCCACT GGTTCTC	60.0
<i>TaPP2-A13-HA-F/R</i>	agacttaagcctaggacgcgtATGGGGGC GGGGGCTTCG	AtcgtatgggtacatagcgcgtCTTGCGTATGCACT CCTCGG	60.0

小写字母表示构建载体时所用酶切位点(下画线)或载体同源序列。

Lowercase letters indicate the restriction enzyme site (underlined) or vector homologous sequence used in constructing the recombinant vector.

1.3 生物信息学分析

DNAStar 软件将 *TaPP2-A13* 基因的编码区翻译为蛋白质序列; ProtParam (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/>)用于分析蛋白质的分子量和等电点; ProtScale (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/>)用于预测蛋白疏水性/亲水性; SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)用于分析蛋白质的保守结构域; SOPMA (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/>)和 Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>)分别用于预测 *TaPP2-A13* 蛋白的二级结构和三级结构; SignalP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>)用于预测信号肽; TMHMM server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)和 ProtComp 9.0 (<http://www.softberry.com/>)分别用于预测跨膜结构域及亚细胞定位; 利用 MEGA7、Clustal X 软件和 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上的蛋白质数据库进行多序列比对分析和进化树构建。

1.4 *TaPP2-A13* 基因表达模式分析

以 1.2 获得的 *TaPP2-A13* 基因全长序列为模板设计 qRT-PCR 引物: *TaPP2-A13*-qPCR-F/*TaPP2-A13*-qPCR-R (表 1)。RNA 提取及第 1 链 cDNA 合成同于 1.2。以小麦三磷酸甘油醛脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *TaGAPDH*, 登录号为 EU022331.1)为内参基因, 引物 *TaGAPDH*-qPCR-F 和 *TaGAPDH*-qPCR-R 序列见表 1。qRT-PCR 参照 2×TransStart Tip Green qPCR SuperMix (TransGen, 中国)说明书进行。反应程序为 94℃ 30 s; 94℃ 5 s, 59.5℃ 15 s, 72℃ 10 s, 40 个循环。*TaPP2-A13* 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算, 利用 Microsoft Excel 2013 进行平均值和标准误差的计算, 利用 SAS 9.4 软件的 ANOVA 进行方差分析。

1.5 亚细胞定位

根据目的基因编码区和 GFP 融合表达载体 pSuper1300-GFP 序列设计引物 *TaPP2-A13*-GFP-F 和 *TaPP2-A13*-GFP-R (表 1)。以 pMD19-T-*TaPP2-A13* 为模板扩增得到带有 *Xba* I 和 *Spe* I 酶切位点的 *TaPP2-A13*, 扩增体系与程序同于 1.2。扩增产物与 pSuper1300-GFP 载体连接, 构建 GFP 融合蛋白的瞬时表达载体。测序验证正确的重组质粒转入农杆菌 GV3101 菌株, 注射器吸取该菌液注入 6~8 周龄的烟草叶片。25℃ 培养 30 h 后, 以 GFP-HQ 荧光滤光块 (激发滤色镜 470 nm/40、分光镜 495 nm 和吸收滤色镜 525 nm/50)在尼康倒置显微镜 Ti2-U (Nikon, 日本)

下观察 GFP 绿色荧光, 以确定 *TaPP2-A13* 的亚细胞定位情况。

1.6 Y2H 分析

用模板 pMD19-T-*TaPP2-A13* 及引物 *TaPP2-A13*-BD-F 和 *TaPP2-A13*-BD-R (表 1)进行 PCR 扩增, 将酶切位点引入 *TaPP2-A13* 两侧, 扩增体系和程序同于 1.2。PCR 产物经 *Eco*R I 和 *Bam* H I 双酶切后, 与同样双酶切的 pGBT9 (BD)载体连接, 重组载体命名为 pGBT9-*TaPP2-A13* (BD-*TaPP2-A13*)。将其转化酵母 Y187 后, 涂布在 SD/-Trp (一缺)、SD/-Trp/-Leu (二缺)、SD/-Leu-Trp-His (三缺)和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade (四缺)固体培养基上, 观察酵母生长状况, 进行毒性和自激活活性验证。

实验室前期已构建 TcLr15 接种叶锈菌株 05-19-43 的抗叶锈病性酵母 AH109 文库^[24], 用诱饵载体 BD-*TaPP2-A13* 筛选该文库, 以获取与 *TaPP2-A13* 互作的蛋白。具体操作参见 Hong 等^[25]的方法。以四缺平板上的单克隆为模板, 利用引物 *TaPP2-A13*-BD-F 和 *TaPP2-A13*-BD-R 进行菌落 PCR, 确认 *TaPP2-A13* 是否存在。再以 pGADT7(AD)载体的通用引物 AD-F 和 AD-R (表 1)进行扩增, 鉴定捕获蛋白基因及其片段大小。挑选条带单一(>500 bp)的菌落 PCR 产物送北京中科希林生物科技有限责任公司测序。

通过蛋白一对一互作方法验证文库筛选结果的准确性。首先将获得的序列在 NCBI 数据库进行 BLAST 比对, 根据比对结果设计各筛选基因的全长扩增引物, 以小麦 TcLr15 叶片 cDNA 为模板, 获得各筛选基因的全长编码区。然后将各个筛选基因的编码区序列分别与 AD 载体连接, 构建 AD-*Prey* 载体。最后将 AD-*Prey* 和 BD-*TaPP2-A13* 共转入酵母菌 AH109 中, 共转化后的菌液经验证后, 再分别稀释为 1:1、1:10 和 1:100, 各取 0.5 μL 稀释后菌液接种至含有 X-α-Gal 的四缺平板上进一步筛选。

1.7 BiFC 分析

根据目的基因编码区和 BiFC 载体 pSPY-NE 序列设计引物 *TaPP2-A13*-NE-F 和 *TaPP2-A13*-NE-R (表 1)。以 pMD19-T-*TaPP2-A13* 为模板扩增得到带有 *Bam* H I 和 *Sal* I 酶切位点的 *TaPP2-A13*, 扩增体系与程序同于 1.2。扩增产物与 pSPY-NE 载体连接, 构建 BiFC 载体 pSPY-NE-*TaPP2-A13*, 随后将其转入农杆菌 GV3101。同时将 pSPY-CE 和 pSPY-CE-*TaSKP1* (已构建)分别转入农杆菌 GV3101。将转

化 pSPY-CE-*TaSKP1* 的农杆菌与转化 pSPY-NE-*TaPP2-A13* 的农杆菌混合, 以 pSPY-CE 和 pSPY-NE-*TaPP2-A13* 混合菌液为阴性对照, 用注射器吸取各混合菌液注入 6~8 周龄的烟草叶片。25℃ 培养 40 h 后, 观察荧光信号及其分布, 仪器及设置同于 1.5。

1.8 Co-IP 分析

以 *TaSKP1* 和 *TaPP2-A13* 的编码区序列分别设计引物 *TaSKP1*-FLAG-F/*TaSKP1*-FLAG-R 和 *TaPP2-A13*-HA-F/*TaPP2-A13*-HA-R (表 1)。以 AD-*TaSKP1* 为模板扩增得到带有 *Xba* I 的 *TaSKP1*, 以 pMD19-T-*TaPP2-A13* 为模板扩增得到带有 *Mlu* I 酶切位点的 *TaPP2-A13*, 扩增体系与程序同于 1.2。pTF101-3FLAG 和 pTF101-6HA 分别经单酶切(*Xba* I 和 *Mlu* I)后与扩增产物连接, 构建 Co-IP 载体 pTF101-3FLAG-*TaSKP1* 和 pTF101-6HA-*TaPP2-A13*, 然后将重组质粒转化农杆菌 GV3101。

将含有重组质粒的农杆菌(OD₆₀₀ 为 0.8) 1:1 混匀后注射 6~8 周龄的烟草叶片。暗培养过夜, 然后转入正常光周期(16 h 光照/8 h 黑暗), 25℃ 培养 40 h 后, 剪取注射的叶片, 提取其总蛋白。以带有第一抗体 anti-HA 的 beads 孵育总蛋白。未经孵育的总蛋白和孵育后的免疫沉淀物分别用 anti-HA 和 anti-FLAG 杂交, 以第二抗体羊抗兔 IgG-HRP 结合第一抗体。杂交完成的 PVDF 膜漂洗干净后淋上混合液(等体积的 A 液和 B 液), 于 Odyssey Fc Imaging System (LI-COR Biosciences, 美国)上以固定程序 Chemi 曝光 2 min, 以显示目的蛋白。

2 结果与分析

2.1 获得一个小麦韧皮部蛋白 2 编码基因 *TaPP2-A13*

以苗期小麦 TcLr15 的叶片 cDNA 为模板, 运用 *TaPP2-A13*-F 和 *TaPP2-A13*-R 扩增得到一特异条带, 大小与预期相符, 测序后确认该序列长度为 1361 bp。在小麦转录组数据库中其 ID 为 Traes CS2D02G397700, 说明该基因序列位于小麦 2D 染色体上。在 NCBI 网站进行 BLASTx 比对, 结果表明, 该序列与普通小麦 D 染色体组的供体种粗山羊草(*Aegilops tauschii*, 登录号为 XP_020187178.1)的 PP2-A13-like 相似性最高, 为 100%; 其次与二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*, 登录号为 XP_010240281.1)中对应序列相似性为 90.66%; 与

短花药野生稻(*Oryza brachyantha*, 登录号为 XP_006652663.1, 84.87%)和小米(*Setaria italic*, 登录号为 XP_004976538.1, 80.53%)等禾本科植物的 PP2-A13/PP2-A13-like 相似性均大于 75%。根据以上比对结果, 将该基因命名为 *TaPP2-A13* (登录号为 MT364339)。

TaPP2-A13 基因编码一个由 298 个氨基酸组成的蛋白质多肽链, 其相对分子量为 33.18 kD, 理论等电点为 6.36, 平均亲水系数为 -0.322, 属于亲水性蛋白。*TaPP2-A13* 蛋白第 22~62 位是 F-box 结构域, 第 128~287 位具有 PP2 结构域, 为 F-box 蛋白家族中 FBP 亚家族。经预测, 该蛋白二级结构中 α -螺旋占 22.82%, β -转角占 6.04%, 无规则卷曲和 β -折叠分别为 46.31%和 24.83%。三维结构主要由无规则卷曲、 α -螺旋和 β -折叠构成, 与二级结构预测结果基本一致。*TaPP2-A13* 蛋白不含信号肽序列和跨膜结构域, 暗示其既非分泌蛋白, 亦非跨膜蛋白。亚细胞定位预测显示, *TaPP2-A13* 定位在细胞核上。

利用 Clustal X 软件对小麦 *TaPP2-A13* 与其他禾本科植物 PP2-A13 进行氨基酸序列比对, 发现各氨基酸序列间均具有较高的相似性, 尤其是在 F-box 结构域和 PP2 结构域 2 个区域。F-box 结构域共包含 41 个氨基酸, 其中 31 个氨基酸是完全保守的, 5 个氨基酸位点仅在一个物种(1 个在二穗短柄草, 1 个在短花药野生稻和 3 个在玉米)中有差别。PP2 结构域共包含 160 个氨基酸, 其中 112 个氨基酸是完全保守的, 有 12 个氨基酸是仅在一个物种(1 个在二穗短柄草, 1 个在 II 型少花古尔德草(*Dichanthelium oligosanthes*), 1 个在短花药野生稻, 2 个在水稻, 1 个在哈氏黍(*Panicum hallii*), 1 个在黍子(*Panicum miliaceum*), 2 个在狗尾草和 3 个在玉米)中有差别。高度保守的氨基酸说明其对于维持 PP2-A13/PP2-A13-like 的功能至关重要(图 1)。

采用 MEGA7 中的 NJ (Neighbor-Joining)法构建系统发育树(图 2)。根据亲缘关系的远近将进化树分为 5 个组。与小麦亲缘关系最近的为小麦近缘种属植物, 如粗山羊草、大麦(*Hordeum vulgare*)、二穗短柄草等, 其 PP2-A13 位于同一进化分支上(V 组)。其中 *TaPP2-A13* 与粗山羊草 AetPP2-A13 的亲缘关系最近, 其氨基酸序列完全一致。*TaPP2-A13* 与 IV 组的玉米、高粱(*Sorghum bicolor*)、谷子(*Setaria italica*)和糜子(*Panicum miliaceum*)等的 PP2-A13 亲缘关系次之。稻类和弯叶画眉草(*Eragrostis curvula*)的

图 1 *TaPP2-A13* 与其他禾本科植物 PP2-A13 氨基酸序列比对

Fig. 1 Alignment for amino acid sequence between *TaPP2-A13* and other PP2-A13 from gramineae plants

黑色框区域为 F-box 结构域, 灰色框区域为 PP2 结构域; 所涉及物种为普通小麦、粗山羊草、二穗短柄草、II 型少花古尔德草、短花药野生稻、粳稻、哈氏黍、糜子、谷子、狗尾草和玉米。

Region with black box represents F-box domain, region with gray frames represents PP2 domain; plant species used in this study are *Triticum aestivum*, *Aegilops tauschii*, *Brachypodium distachyon*, *Dichanthelium oligosanthes*, *Oryza brachyantha*, *Oryza sativa*, *Panicum hallii*, *Panicum miliaceum*, *Setaria italica*, *Setaria viridis*, and *Zea mays*.

PP2-A13 聚为一类(III 组)。乌拉尔图小麦处于单独的分支, 为 II 组。木本植物如胡杨树(*Populus euphratica*)、小垫柳(*Salix brachista*)和银叶玫瑰木(*Rhodamnia argentea*)等及双子叶植物蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)和石斛兰(*Dendrobium catenatum*)等的 PP2-A13 聚为一类(I 组)。I 组、II 组和 III 组的 PP2-A13 序列与第 V 组相应序列的亲缘关系更远些。

2.2 小麦中 *TaPP2-A13* 在基因水平的表达响应激素处理及生物和非生物胁迫

为了解 *TaPP2-A13* 基因受激素诱导表达的情况, 分别对小麦 TcLr15 进行 ABA、SA 和 MeJA 处理。经 3 种外源激素处理后, 随处理时间延长, *TaPP2-A13* 基因均呈现稳步地显著上升表达趋势。ABA 处理 0.5 h 时, *TaPP2-A13* 基因的表达量与 0 h 样品无异, 自处理 2 h 时开始升高, 12 h 时的表达量

约为 0 h 样品的 5 倍, 24 h 突然降低至 0 h 样品的 3 倍左右, 然后再次升高, 在所取样时间范围内, 48 h 时表达量达到最高, 为 0 h 样品的 5.3 倍; SA 处理小麦叶片 6 h 时, *TaPP2-A13* 基因的表达量与 0 h 样品差异不大, 自 12 h 开始表达量升高, 24 h 时 *TaPP2-A13* 基因表达量达到最大, 为 0 h 样品的 6 倍, 48 h 虽然有所下降但仍为对照的 5.2 倍; MeJA 处理后, 小麦 *TaPP2-A13* 基因的表达量在 6 h 时开始缓慢升高, 在所取样品的时间范围内, 48 h 时表达量达到最高, 为 0 h 样品的 2.8 倍(图 3)。经 3 种抗病/抗逆相关激素处理小麦 TcLr15 后, SA 和 ABA 可以诱发 *TaPP2-A13* 基因更高的表达, 其中, ABA 呈现更早的诱发, 而 SA 诱导 *TaPP2-A13* 基因的表达更强。

本研究设置 3 种非生物逆境处理小麦 TcLr15 幼苗。在 H_2O_2 胁迫下, 随着处理时间延长, *TaPP2-A13* 基因整体呈现下调的表达趋势。0.5 h 的表达量与 0 h

图 2 植物 PP2-A13 系统发育树图
Fig. 2 Phylogenetic tree of plant PP2-A13

进化树外部的实线: 植物 PP2-A13 蛋白的进化分支; ●: TaPP2-A13 蛋白; 所涉及物种为深圳拟兰、小兰屿蝴蝶兰、石斛兰、海枣、油棕榈、食用象腿蕉、野蕉、马来西亚野生香蕉、罂粟、博落回、银叶玫瑰木、蕹菜苜蓿、麻风树、小垫柳、胡杨树、凤梨、乌拉尔图小麦、弯叶画眉草、短花药野生稻、梗稻、粳稻、玉米、高粱、狗尾草、谷子、II 型少花古尔德草、糜子、哈氏黍、二穗短柄草、大麦、普通小麦和粗山羊草。

Solid line outside of the phylogenetic tree: the clade of plant PP2-A13 proteins; ●: TaPP2-A13 protein; Plant species used are *Apostasia shenzhenica*, *Phalaenopsis equestris*, *Dendrobium catenatum*, *Phoenix dactylifera*, *Elaeis guineensis*, *Ensete ventricosum*, *Musa balbisiana*, *Musa acuminata*, *Papaver somniferum*, *Macleaya cordata*, *Rhodamnia argentea*, *Medicago truncatula*, *Jatropha curcas*, *Salix brachista*, *Populus euphratica*, *Ananas comosus*, *Triticum urartu*, *Eragrostis curvula*, *Oryza brachyantha*, *Oryza sativa japonica* Group, *Oryza sativa indica* Group, *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, *Setaria viridis*, *Setaria italica*, *Dichanthelium oligosanthes*, *Panicum miliaceum*, *Panicum hallii*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, and *Aegilops tauschii*.

样品几乎无差异, 自 2 h 开始表达量持续下降, 至 48 h 时表达量仅为 0 h 的 1/5; 在 PEG 模拟的干旱胁迫条件下, 从 0.5 h 开始 *TaPP2-A13* 基因表达量即出现明显下降, 在所取样的时间范围内, 24 h 时表达量最低, 仅为对照的 3/50; NaCl 处理后, *TaPP2-A13* 基因在前 3 个时间点出现明显地上调表达, 6 h 时表达量为 0 h 的 4.8 倍, 而后表达量显著下调, 至 24 h 时达到最低值, 为 0 h 样品的 2/5 (图 4-A)。3 种逆境条件下, 氧化胁迫和干旱胁迫使 *TaPP2-A13* 基因呈现

显著地下调表达, 而盐胁迫则诱导 *TaPP2-A13* 基因在短时间内显著上调表达。

小麦 TcLr15 与叶锈菌形成的感病(05-5-137) 及抗病(05-19-43) 组合中, *TaPP2-A13* 基因均呈现先下调再上调的表达趋势。在抗病组合中, 接种叶锈菌株 05-19-43 6 h 后, *TaPP2-A13* 的表达量即开始下降, 12 h 达到最低, 为 0 h 的 1/4, 随后开始升高, 48 h 时的表达量恢复到与 0 h 样品相同水平, 96 h 时升高到 0 h 样品的 2.4 倍; 在感病组合中, 接菌 6 h

图 3 不同外源激素处理下小麦 TcLr15 中 *TaPP2-A13* 基因的表达模式

Fig. 3 Expression patterns of *TaPP2-A13* gene under different exogenous hormones treatment in wheat

内参基因为 *TaGAPDH*; *表示不同时间点样品与 0 h 样品相比差异显著 ($P < 0.05$); 误差线为每组处理的标准误差 ($n = 3$)。 *TaGAPDH* served as a reference gene. * indicates significant differences at $P < 0.05$ in samples at different treatment time points compared to the sample at 0 hour. Error bars represent the standard error of each sample ($n = 3$).

的样品表达量与 0 h 样品无显著变化, 12 h 出现显著下调, 之后表达量开始升高, 在取样的时间范围内 96 h 表达量达到最高值, 为 0 h 样品的 4.3 倍(图 4-B)。比较抗/感病组合间表达的趋势, 发现 *TaPP2-A13* 在感病组合各个时间点的表达量均高于抗病组合。

2.3 *TaPP2-A13* 亚细胞定位于细胞核和细胞质中

为明确 *TaPP2-A13* 在细胞内发挥生物学功能的场所, 本试验对其亚细胞定位进行观察。结果如图 5

所示, 25℃培养 30 h 时, 阳性对照叶片中的绿色荧光遍布整个视野, 表明实验体系及烟草生长状况均较好。但此时样品中尚无绿色荧光出现。25℃继续培养至 48 h 时, 在细胞核和细胞质中可见较强绿色荧光。以上观察结果表明 *TaPP2-A13* 定位在细胞核和细胞质中。

2.4 *TaPP2-A13* 与 *TaSKP1* 在细胞内相互作用

2.4.1 酵母双杂交确定 5 种蛋白与 *TaPP2-A13* 存在物理相互作用 为解析 *TaPP2-A13* 在细胞内发挥作用的机制, 拟筛选胞内与其有相互作用的蛋白并进行验证。首先构建诱饵表达载体 BD-*TaPP2-A13*, 将其转化酵母感受态细胞 Y187 后涂布于一缺、二缺、三缺和四缺平板上。经验证, 重组质粒对酵母细胞无毒性, 亦无自激活能力。

以 BD-*TaPP2-A13* 为诱饵载体, 筛选酵母文库。挑选 20 个扩增条带单一且条带大于 500 bp 的克隆进行序列测定。测序结果在 NCBI 网站上进行 BLASTx 比对, 结果表明 11 种候选蛋白可能与 *TaPP2-A13* 存在相互作用(表 2)。其中一部分与植物光合和呼吸作用相关, 如核酮糖二磷酸羧化酶小链 (ribulose-bisphosphate carboxylase small chain, RbcS)、核酮糖二磷酸羧化酶活化酶 B (ribulose bisphosphate carboxylase activase B, RcaB)、RUBISCO 活化酶 β 基因(*rca1_beta* gene for RUBISCO activase beta, *TaRca1_beta*)、核酮糖活化酶 A (ribulose activase A, RcaA)和 Fe-S 蛋白的前体蛋白(Fe-S precursor protein)等^[26-27]。另有一部分与植物生长发育、抗病及激素信号转导相关, 如 SCF

图 4 不同生物/非生物胁迫下小麦 TcLr15 中 *TaPP2-A13* 基因的表达模式

Fig. 4 Expression patterns of *TaPP2-A13* gene under different biotic/abiotic stresses in wheat

内参基因为 *TaGAPDH*; *表示不同时间点样品与 0 h 样品相比差异显著 ($P < 0.05$); 误差线为每组处理的标准误差 ($n = 3$)。 *TaGAPDH* served as a reference gene. * indicates significant differences at $P < 0.05$ in samples at different treatment time points compared to the sample at 0 hour. Error bars represent the standard error of each sample ($n = 3$).

TaGAPDH served as a reference gene. * indicates significant differences at $P < 0.05$ in samples at different treatment time points compared to the sample at 0 hour. Error bars represent the standard error of each sample ($n = 3$).

图 5 TaPP2-A13-GFP 融合蛋白的亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of TaPP2-A13-GFP protein

绿色表示 GFP 蛋白在荧光显微镜下所发出的绿色荧光; 标尺为 100 μm。

The green fluorescence under fluorescence microscope represents GFP protein. Bar = 100 μm.

复合体骨架蛋白 SKP1^[28]、UDP 葡萄糖类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶 7 (UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase 7, UFGT7)^[29]、蛋白磷酸酶 (Protein phosphatase 2C 5, PP2C5)^[30]、几丁质酶 (Chitinase, CHI)^[31]和酮酰 CoA 硫醇酶(3-ketoacyl-CoA thiolase 2, KAT2)^[32]及 SEC1 蛋白家族的 SLY1 (SEC1 family transport protein SLY1)^[33]等。

根据文库筛选获得序列, 结合实验室前期研究结果, 开展酵母一对一互作验证。构建的重组质粒 AD-prey (筛选基因)分别与 BD-TaPP2-A13 共转化酵母菌株 AH109, 在含有 X-α-Gal 的四缺固体培养基上进行回复验证。结果如图 6 所示, AD-TaPP2C5、AD-TaSLY1、AD-TaCHI、AD-TaRbcS 和 AD-TaSKP1 分别与 BD-TaPP2-A13 形成的 5 个组合在含有

X-α-Gal 的四缺培养基上均能正常生长, 且菌落呈现蓝色, 初步证明 TaPP2C5、TaSLY1、TaCHI、TaRbcS 和 TaSKP1 与 TaPP2-A13 存在物理性相互作用。

2.4.2 BiFC 确定 TaPP2-A13 与 TaSKP1 存在相互作用 将 TaSKP1 和 TaPP2-A13 分别与载体 pSPY-CE 和 pSPY-NE 连接, 构建 pSPY-CE-TaSKP1 和 pSPY-NE-TaPP2-A13 载体。将 pSPY-CE 和 pSPY-CE-TaSKP1 分别与 pSPY-NE-TaPP2-A13 混合, 注射烟草叶片, 培养 40 h 后进行荧光观察。pSPY-CE 和 pSPY-NE-TaPP2-A13 形成的阴性对照中无荧光信号, 实验组合中可见绿色荧光信号, 且荧光信号主要集中在细胞核和细胞质(图 7), 表明 TaSKP1 与 TaPP2-A13 存在相互作用。

表 2 TaPP2-A13 筛选酵母文库的结果

Table 2 Results of library screening by TaPP2-A13

登录号 Accession No.	蛋白名称 Protein name	克隆数 Number of clones
XP_020153404.1	Protein phosphatase 2C 5 (PP2C5)	1
KU857044.1	S-phase kinase-associated protein 1 (SKP1)	1
XM_020332687.1	UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyl transferase 7-like	3
EMS45698.1	SEC1 family transport protein SLY1	1
XM_020338494.1	3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal-like	2
LM992844.1	Rca1_beta gene for RUBISCO activase beta (TaRca1_beta)	3
KC776912.1	Ribulose activase A	2
AK330458.1	Ribulose-bisphosphate carboxylase small chain (RbcS)	1
AF251264.1	Ribulose bisphosphate carboxylase activase B (RcaB)	3
AY123222.1	Putative Fe-S precursor protein	2
BAB82472.1	Chitinase 2	1

图 6 Y2H 验证 TaPP2-A13 与筛选蛋白间的相互作用
Fig. 6 Interaction of TaPP2-A13 and screening proteins identified by Y2H

2.4.3 Co-IP 证实 TaPP2-A13 与 TaSKP1 在胞内存在相互作用 构建重组载体 pTF101-3FLAG-TaSKP1 和 pTF101-6HA-TaPP2-A13, 分别将其转入农杆菌 GV3101, 混合 2 种菌液后共注射 6~8 周龄本氏烟草叶片。提取烟草总蛋白, 利用 HA 和 FLAG 抗体分别进行杂交实验。已知 TaPP2-A13 的预测分子量为 33.18 kD, TaSKP1 的预测分子量为 19.06 kD, 载体上 HA 和 FLAG 标签蛋白的分子量分别为 7.54 kD 和 4.06 kD。融合蛋白 TaPP2-A13-6HA 和 TaSKP1-3FLAG 的分子量大小应该为 40.72 kD 和 23.12 kD。由图 8 可知, 未瞬时表达 TaPP2-A13-6HA 和 TaSKP1-3FLAG 的烟草叶片, 其全蛋白无杂交的目的条带, 而在瞬时表达 TaPP2-A13-6HA 和 TaSKP1-3FLAG 的材料中, 其全蛋白与 HA 抗体或 FLAG 抗体分别杂交获得目的蛋白。进一步利用带有 anti-HA 的磁珠进行总蛋白的免疫沉淀, 沉淀蛋白中富含 TaPP2-A13-6HA 和 TaSKP1-3FLAG, 说明 TaPP2-A13 和 TaSKP1 在植物细胞内是互作的(图 8)。

图 7 BiFC 验证 TaPP2-A13 和 TaSKP1 的相互作用
Fig. 7 Interaction of TaPP2-A13 and TaSKP1 identified by BiFC
绿色表示 GFP 蛋白在荧光显微镜下所发出的绿色荧光; 标尺为 100 μ m。
The green fluorescence under fluorescence microscope represents GFP protein. Bar = 100 μ m.

图 8 Co-IP 分析本氏烟草叶片中 TaPP2-A13 与 TaSKP1 的互作
Fig. 8 Interaction of TaPP2-A13 and TaSKP1 in *Nicotiana benthamiana* leaves by Co-IP
将烟草总蛋白提取物与带有 anti-HA 的 beads 一起孵育, 通过 anti-FLAG 和 anti-HA 进行免疫沉淀物分析。
Total protein extracts of *N. benthamiana* were incubated with anti-HA affinity beads, the immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting with anti-FLAG and anti-HA antibodies.

3 讨论

利用同源克隆技术自小麦 TcLr15 中首次获得了 *TaPP2-A13* 基因, 其编码蛋白的 N 端为一个保守的 F-box 结构域, C 端具有一个 PP2 结构域, 属于典型的 FBP 亚家族。本实验室前期已得到了小麦 F-box 基因 *TaFBL14* 和 *TaSKP2A*^[34-35], 这 2 个基因与 *TaPP2-A13* 虽然同属于 F-box 家族, 不同的是, *TaFBL14* 和 *TaSKP2A* 的 C 端含有典型的 LRR 结构域, 属于 FBL 亚家族, 同时实验室也已获得了 C 端含有 Kelch 结构域的 FBK 亚家族成员^[36]。Zhou 等^[8]获得的 *TaFBA1* 属于 FBA 亚家族。由此可见, 小麦

中存在不同类型的 F-box 亚家族成员。各个亚家族成员是否存在功能差异尚未可知。

近年来, F-box 蛋白在植物抵御病原细菌和真菌侵染中的作用日益引起关注。例如, F-box 基因 *CPR30* 在拟南芥抵御病原细菌 *P. syringae* 的入侵过程中起着负调控作用^[13]; 棉花(*Gossypium hirsutum*) F-box 蛋白 GhACIF1 通过与 GhSKP1 互作增强陆地棉对棉花黄萎病致病菌-大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)的抗性^[37]; BIG-24.1 是分离自葡萄叶片中的 F-box 蛋白, 当葡萄受到灰霉菌感染时, 叶片及浆果中 *BIG-24.1* 的表达量显著上升^[14]; 此外, SON1、MAX2、COI1、Nictaba 等 F-box 家族成员在植物抵御病原菌侵染过程中均发挥着重要作用^[38-40]。但尚未见 F-box 蛋白在小麦抵御叶锈菌侵染过程中发挥作用的报道。本研究对小麦叶片中 *TaPP2-A13* 基因受叶锈菌侵染后的表达情况进行分析, 发现随叶锈菌侵染进程的延伸, 该基因在抗病及感病组合中均呈现上调表达, 且在感病组合中呈现更加强烈的上调(96 h 时, 感病组合的表达量是抗病组合的 2 倍)。长春花在遭受黄龙病菌感染后, 韧皮部蛋白基因 *PP2-B11* 和 *PP2-B15* 显著上调, 而 *PP2-A1* 和 *PP2-A13* 则下调。*PP2-A13* 在受到不同病原菌侵染后呈现差异的表达模式。柑橘黄龙病致病菌为细菌, 而小麦叶锈病菌为专性寄生真菌, 细菌和真菌在侵染植物后引起的抗/感病路径不同, 启动抗病相关基因的表达不同, 这可能是造成相同基因在不同植物-病原物组合中表达模式不同的主要原因。

植物 F-box 蛋白也响应各种非生物胁迫过程。例如, FBP7、DOR、MAX2 等在响应非生物胁迫方面均发挥重要作用^[12,41-42]。*TaPP2-A13* 基因受 MeJA 诱导呈现上调表达, 在 SA、ABA 和 NaCl 处理后呈现先上调后下调的表达趋势, 经 H₂O₂ 和 PEG 处理后, *TaPP2-A13* 随处理时间延长总体呈现显著下调的表达模式, 说明 *TaPP2-A13* 的表达受到包括叶锈病菌侵染、外源激素和非生物逆境在内的共同影响。相同的结果见于 F-box 基因 *BIG-24.1*, 该基因不仅受灰霉菌的强烈诱导, 对 UV-C、伤害、SA、ABA、MeJA、乙烯等非生物胁迫和激素也反应强烈^[14]。这说明植物 F-box 家族的一些成员参与多种非生物胁迫的调节过程。

本研究试图找到胞内与 *TaPP2-A13* 具有相互作用的蛋白。通过筛选抗叶锈病小麦 TcLr15 的酵母 cDNA 文库, 获得了 11 种可能与 *TaPP2-A13* 互作的

蛋白。但由于酵母文库筛选方法假阳性率较高, 进一步运用 Y2H 确定 *TaPP2C5*、*TaSLY1*、*TaCHI*、*TaRbcS*、*TaSKP1* 与 *TaPP2-A13* 存在相互作用。Hong 等^[25]发现 *TaKFB1* 和 *TaKFB3* 经过酵母文库筛选分别获得了 61 个和 74 个克隆, 进一步验证确定 *TaKFB1* 与 4 个蛋白存在相互作用, *TaKFB3* 与 3 个蛋白存在相互作用, 且这 2 个 *TaKFB* 蛋白都能与 *TaSKP1s* 蛋白相互作用。这说明 1 个 F-box 蛋白可识别多个底物, 且 1 个 F-box 蛋白可能与多个 SKP1 蛋白相结合。

SKP1 是 SCF (SKP1-CUL1-F-box protein)复合体的组分, 能够与 F-box 蛋白中的 F-box 结构域直接结合, 从而参与靶蛋白的泛素化过程。经预测, *TaPP2-A13* 和 *TaSKP1* 均无信号肽结构, 且 *TaSKP1* 的亚细胞定位预测结果为细胞核, 这为二者在空间上互作提供了可能性。据报道, *AtPP2-B11* 能与 SCF 复合体骨架蛋白 SKP1 家族成员 ASK7、ASK18 和 ASK19 互作, 暗示其具有 F-box 蛋白的功能。同时过表达牡丹(*Paeonia suffruticosa*) *PSK1* 基因的拟南芥耐盐性得到显著提高^[28], 同样的结论在大豆 *GmSK1* 过表达的烟草中得到了印证, 此外, 过表达 *GmSK1* 的烟草还表现出对干旱胁迫有较强的耐受性。本研究通过 Y2H、BiFC 和 Co-IP 实验证实 *TaPP2-A13* 与 *TaSKP1* 存在相互作用, 因此推测 *TaPP2-A13* 可能为 SCF 复合体的组分, 通过与 *TaSKP1* 结合实现其响应生物/非生物逆境过程的作用。

PP2C5 是可以调控植物 ABA 信号通路的丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶, 该酶既影响植物的生长发育, 又在植物抵御非生物胁迫和抗病过程中发挥作用^[30]; *SLY1* 属于 SEC1 蛋白家族, 其亚细胞定位为高尔基体。酵母中的 *SLY1* 参与了内质网到高尔基体的囊泡运输过程^[43]。目前, SEC1 家族蛋白的研究主要集中在酵母、线虫(*Limnodrilus hoffmeisteri*)和大鼠(*Rattus norvegicus*)中^[33], 其在植物中的研究鲜见报道; *CHI* 在植物体中普遍存在, 病原真菌攻击、真菌细胞壁的刺激和乙烯等均能诱导植物体内几丁质酶的快速积累。此外, 几丁质酶也会响应重金属、渗透压和干旱等非生物逆境胁迫^[44]。在活体外, 几丁质酶能高度抑制真菌的生长^[31]。根据 Melchers 等^[45]的分类方法, 本研究中获得的小麦 *TaCHI* 为 I 类几丁质酶。烟草中的 I 类几丁质酶定位于植物液泡中^[46], 本研究获得的 *TaCHI* 亚细胞定位预测也是液泡中。*RbcS* 基因编码的蛋白质已被证明影响 Rubisco

的催化效率、组装、活性及其稳定性^[47]。研究发现拟南芥中 *RbcS* 的表达存在组织特异性且受光的诱导^[27]。本文通过 Y2H 技术证实 TaPP2-A13 分别与 TaPP2C5、TaSLY1、TaCHI 和 TaRbcS 存在相互作用, 该结果仍需其他蛋白互作技术深入验证。

4 结论

自小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr15 中分离了 1 个小麦 FBP 亚家族基因 *TaPP2-A13*; 该基因所编码蛋白在小麦近缘种属中的进化比较保守; 定位于细胞核和细胞质上; 受叶锈菌侵染、外源激素和非生物逆境处理后, *TaPP2-A13* 基因表达量呈现上调或下调的显著变化。文库筛选获得 11 种与 TaPP2-A13 互作的蛋白, Y2H 验证表明 TaPP2C5、TaSLY1、TaCHI、TaRbcS、TaSKP1 与 TaPP2-A13 存在物理相互作用, BiFC 和 Co-IP 深入研究确定 TaSKP1 与 TaPP2-A13 存在相互作用。

References

- [1] Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebl M, Harper J W, Elledge S J. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*, 1996, 86: 263–274.
- [2] Gonzalez Carranza Z H, Zhang X, Peters J L, Boltz V, Szecsi J, Bendahmane M, Roberts J A. HAWAIIAN SKIRT controls size and floral organ number by modulating CUC1 and CUC2 expression. *PLoS One*, 2017, 12: e0185106.
- [3] Levin J Z, Meyerowitz E M. *UFO*: an *Arabidopsis* gene involved in both floral meristem and floral organ development. *Plant Cell*, 1995, 7: 529–548.
- [4] Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 2005, 435: 441–445.
- [5] Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He S Y, Howe G A, Browse J. JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. *Nature*, 2007, 448: 661–665.
- [6] Sijacic P, Wang X, Skirpan A L, Wang Y, Dowd P E, McCubbin A G, Huang S, Kao T H. Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature*, 2004, 429: 302305.
- [7] Williams J S, Der J P, dePamphilis C W, Kao T H. Transcriptome analysis reveals the same 17 S-locus F-box genes in two haplotypes of the self-incompatibility locus of *Petunia inflata*. *Plant Cell*, 2014, 26: 2873–2888.
- [8] Zhou S M, Sun X D, Yin S H, Kong X Z, Zhou S, Xu Y, Luo Y, Wang W. The role of the F-box gene *TaFBA1* from wheat (*Triticum aestivum* L.) in drought tolerance. *Plant Physiol Biochem*, 2014, 84: 213–223.
- [9] Zhou S M, Kong X Z, Kang H H, Sun X D, Wang W. The involvement of wheat F-box protein gene *TaFBA1* in the oxidative stress tolerance of plants. *PLoS One*, 2015, 10: e0122117.
- [10] Zhao Z X, Zhang G Q, Zhou S M, Ren Y Q, Wang W. The improvement of salt tolerance in transgenic tobacco by overexpression of wheat F-box gene *TaFBA1*. *Plant Sci*, 2017, 259: 71–85.
- [11] Li Q X, Wang W Q, Wang W L, Zhang G Q, Liu Y, Wang Y, Wang W. Wheat F-box protein gene *TaFBA1* is involved in plant tolerance to heat stress. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 521.
- [12] An J P, Li R, Qu F J, You C X, Wang X F, Hao Y J. Apple F-box protein MdMAX2 regulates plant photomorphogenesis and stress response. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1685.
- [13] Gou M Y, Su N, Zheng J, Huai J L, Wu G H, Zhao J F, He J G, Tang D Z, Yang S H, Wang G Y. An F-box gene, *CPR30*, functions as a negative regulator of the defense response in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2009, 60: 757–770.
- [14] Paquis S, Mazeyrat Gourbeyre F, Fernandez O, Crouzet J, Clément C, Baillieul F, Dorey S. Characterization of a F-box gene up-regulated by phytohormones and upon biotic and abiotic stresses in grapevine. *Mol Biol Rep*, 2011, 38: 3327–3337.
- [15] Dinant S, Clark A M, Zhu Y, Vilaine F, Palauqui J C, Kusiak C, Thompson G A. Diversity of the superfamily of phloem lectins (phloem protein 2) in angiosperms. *Plant Physiol*, 2003, 131: 114–128.
- [16] Li Y Z, Jia F J, Yu Y L, Luo L, Huang J G, Yang G D, Wu C A, Zheng C C. The SCF E3 ligase AtPP2-B11 plays a negative role in response to drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol Rep*, 2014, 32: 943–956.
- [17] Lee J R, Boltz K A, Lee S Y. Molecular chaperone function of *Arabidopsis thaliana* phloem protein 2-A1, encodes a protein similar to phloem lectin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443: 18–21.
- [18] Read S M, Northcote D H. Subunit structure and interactions of the phloem proteins of *Cucurbita maxima* (pumpkin). *Eur J Biochem*, 1983, 134: 561–569.
- [19] Liu X F, Zheng Y, Wang P G, Gan Y, Zhang B, Hu Q Y, Du Y, Zhao J W, Liu L H. Transcriptome profiling of periwinkle infected with Huanglongbing (“Candidatus Liberibacter asiaticus”). *Eur J Plant Pathol*, 2019, 153: 891–906.
- [20] 文庆利, 谢竹, 吴柳, 何永睿, 陈善春, 邹修平. 柑橘响应黄龙病侵染的韧皮部蛋白 2 基因 *CsPP2B15* 的克隆与表达分析. *园艺学报*, 2018, 45: 2347–2357.
Wen Q L, Xie Z, Wu L, He Y R, Chen S C, Zou X P. Clone and expression analysis of the citrus phloem protein 2 gene *CsPP2B15* responding to Huanglongbing infection in citrus. *Acta Horticult Sin*, 2018, 45: 2347–2357 (in Chinese with English abstract).
- [21] Guo P G, Zheng Y C, Peng D X, Liu L J, Dai L J, Chen C, Wang B. Identification and expression characterization of the Phloem Protein 2 (PP2) genes in ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaudich). *Sci Rep*, 2018, 8: 1–13.
- [22] Kolmer J A. Virulence heterozygosity and gametic phase disequilibrium in two populations of *Puccinia recondita* (wheat leaf rust fungus). *Heredity*, 1992, 68: 505–513.
- [23] 孟钰玉, 李虎滢, 许媛, 魏春茹, 范润侨, 于秀梅, 赵伟全, 康振生, 刘大群. 小麦 *TaSKP2A* 基因抗逆相关表达分析及与其互作蛋白的筛选. *农业生物技术学报*, 2020, 28: 571–581.
Meng Y Y, Li H Y, Xu Y, Wei C R, Fan R Q, Yu X M, Zhao W Q, Kang Z S, Liu D Q. Anti-stress related expression analysis of

- TaSKP2A* gene in wheat (*Triticum aestivum*) and its interaction protein screening. *J Agric Biotech*, 2020, 28: 571–581 (in Chinese with English abstract).
- [24] 许媛. 小麦 F-box/LRR 类基因 *Ta-SKP2A* 的克隆、表达模式分析及其互作靶蛋白筛选. 河北农业大学硕士学位论文, 河北保定, 2016.
- Xu Y. Wheat F-box/LRR Like Gene *Ta-SKP2A* Cloning, Expression Profile Analyzing and Target Proteins Screening. MS Thesis of Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei, China, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [25] Hong M J, Kim D Y, Choi H I, Seo Y W, Kim J B. Isolation and characterization of kelch repeat-containing F-box proteins from colored wheat. *Mol Biol Rep*, 2020, 47: 1129–1141.
- [26] Balk J, Lobréaux S. Biogenesis of iron–sulfur proteins in plants. *Trends Plant Sci*, 2005, 10: 324–331.
- [27] Fluhr R, Moses P, Morelli G, Coruzzi G, Chua N H. Expression dynamics of the pea *rbcS* multigene family and organ distribution of the transcripts. *EMBO J*, 1986, 5: 2063–2071.
- [28] Hao Q, Ren H X, Zhu J, Wang L S, Huang S C, Liu Z A, Gao Z M, Shu Q Y. Overexpression of *PSK1*, a *SKP1-like* gene homologue, from *Paeonia suffruticosa*, confers salinity tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 2017, 36: 151–162.
- [29] Chong J L, Baltz R, Schmitt C, Beffa R, Fritig B, Saindrenan P. Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc: phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *Plant Cell*, 2002, 14: 1093–1107.
- [30] Paz G G M, Dolores R, Carlos N, Luis R P, Gregorio N, Oscar L. Negative regulation of abscisic acid signaling by the *Fagus sylvatica* *FsPP2C1* plays a role in seed dormancy regulation and promotion of seed germination. *Plant Physiol*, 2003, 133: 135–144.
- [31] Boller T, Gehri A, Mauch F, Vögeli U. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta*, 1983, 157: 22–31.
- [32] Jiang T, Zhang X F, Wang X F, Zhang D P. Arabidopsis 3-ketoacyl-CoA thiolase-2 (KAT2), an enzyme of fatty acid β -oxidation, is involved in ABA signal transduction. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52: 528–538.
- [33] 张海龙, 赵潇男, 申哲, 杨孝丽, 张忠阳, 李立新. SM 蛋白 Sly1 家族在膜泡运输中的重要作用. 北京: 中国科技论文在线, 2015, <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201503-31>.
- Zhang H L, Zhao X N, Shen Z, Yang X L, Zhang Z Y, Li L X. SM protein Sly1 family plays an important role in vesicle transport. Sciencepaper Online, 2015, <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201503-31> (in Chinese with English abstract).
- [34] 李铃仙, 魏春茹, 李虎滢, 魏新燕, 于秀梅. 小麦 F-box 基因 *TaFBL14* 的克隆及表达分析. 西北植物学报, 2017, 37: 232–238.
- Li L X, Wei C R, Li H Y, Wei X Y, Yu X M. Cloning and expression analyses of F-box gene *TaFBL14* in wheat. *Acta Bot Boreali-occident Sin*, 2017, 37: 232–238 (in Chinese with English abstract).
- [35] 许媛, 李铃仙, 魏春茹, 魏新燕, 于秀梅, 刘大群. 小麦 *Ta-SKP2A* 克隆及其酵母双杂交诱饵载体的构建. 华北农学报, 2016, 31: 17–22.
- Xu Y, Li L X, Wei C R, Wei X Y, Yu X M, Liu D Q. Cloning and construction of yeast two-hybrid bait vector of wheat *Ta-SKP2A* gene. *Acta Agric Boreali-Sin*, 2016, 31: 17–22 (in Chinese with English abstract).
- [36] 魏春茹, 孟钰玉, 范润侨, 赵梦伊, 于秀梅, 赵伟全, 康振生, 刘大群. 小麦 F-box/Kelch 类基因 *TaFKOR23* 的抗逆相关表达模式及分子互作蛋白鉴定. 植物遗传资源学报, 2020, 21: 694–704.
- Wei C R, Meng Y Y, Fan R Q, Zhao M Y, Yu X M, Liu D Q. Stress-related expression profile of F-box/Kelch gene *TaFKOR23* in wheat and molecular characterization of the interacting target protein. *J Plant Genet Resour*, 2020, 21: 694–704 (in Chinese with English abstract).
- [37] Li X C, Sun Y, Liu N N, Wang P, Pei Y K, Liu D, Ma X W, Ge X Y, Li F G, Hou Y X. Enhanced resistance to verticillium dahliae mediated by an F-box protein GhACIF1 from *Gossypium hirsutum*. *Plant Sci*, 2019, 284: 127–134.
- [38] Kim H S, Delaney T P. Arabidopsis SON1 is an F-box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 2002, 14: 1469–1482.
- [39] An L K, Ahmad R M, Ren H, Qin J, Yan Y X. Jasmonate signal receptor gene family *ZmCOIs* restore male fertility and defense response of *Arabidopsis* mutant *coi1-1*. *J Plant Growth Regul*, 2019, 38: 479–493.
- [40] Eggermont L, Stefanowicz K, Van Damme E J. Nictaba homologs from *Arabidopsis thaliana* are involved in plant stress responses. *Front Plant Sci*, 2018, 8: 2218.
- [41] Calderón Villalobos L I A, Nill C, Marrocco K, Kretsch T, Schwechheimer C. The evolutionarily conserved *Arabidopsis thaliana* F-box protein AtFBP7 is required for efficient translation during temperature stress. *Gene*, 2007, 392: 106–116.
- [42] Xu W Y, Li Z H, Deng X W, Wu W H, Xue Y B. F-box protein DOR functions as a novel inhibitory factor for abscisic acid-induced stomatal closure under drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2008, 148: 2121–2133.
- [43] Peterson M R, Hsu S C, Scheller R H. A mammalian homologue of *SLY1* a yeast gene required for transport from endoplasmic reticulum to Golgi. *Gene*, 1996, 169: 293–294.
- [44] 欧阳石文, 赵开军, 冯兰香. 植物中几丁质酶的作用. 生物学通报, 2002, 37: 13–14.
- Ou-Yang S W, Zhao K J, Feng L X. The effect of chitinase in plants. *Bull Biol*, 2002, 6: 13–14 (in Chinese).
- [45] Melchers L S, de Groot M A, Van Der Knaap J A, Ponstein A S, Sela Buurlage M B, Bol J F, Cornelissen B J, Van Den Elzen P J, Linthorst H J. A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *Plant J*, 1994, 5: 469–480.
- [46] Sela Buurlage M B, Ponstein A S, Bres Vloemans S A, Melchers L S, Van den Elzen P J, Cornelissen B J. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and [beta]-1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol*, 1993, 101: 857–863.
- [47] Yamada K, Davydov I I, Besnard G, Salamin N. Duplication history and molecular evolution of the *rbcS* multigene family in angiosperms. *J Exp Bot*, 2019, 70: 6127–6139.