

蒋正宁, 别同德, 赵仁惠, 等. 受条锈菌诱导的小麦丝氨酸苏氨酸激酶基因 *TaS/TK* 的克隆与表达[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(5): 980-986.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.05.004

## 受条锈菌诱导的小麦丝氨酸苏氨酸激酶基因 *TaS/TK* 的克隆与表达

蒋正宁, 别同德, 赵仁惠, 高德荣, 吴旭江, 张伯桥

(江苏里下河地区农业科学研究所/农业部长江中下游小麦生物与遗传改良重点实验室, 江苏 扬州 225007)

**摘要:** 以小麦基因芯片数据获得的 1 个受条锈病菌诱导上调表达的 EST 序列为探针, 从小麦中克隆抗条锈病相关基因 *TaS/TK*, 并对其序列特征、进化关系和表达特征进行分析。结果表明: *TaS/TK* 基因 cDNA 全长为 1 582 bp, 包含 1 239 bp 的 ORF、139 bp 的 5'UTR 以及 240 bp 的 3'UTR, 编码 412 个氨基酸, 分子量 47 120, 等电点为 5.84, 并将其定位于小麦 5B 染色体; SMART 软件分析结果表明 *TaS/TK* 仅存在 1 个典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域; 经激酶区 Blastp 比对分析, *TaS/TK* 与其他植物同源性较低, 与同源性最高的短柄草仅为 59%; qRT-PCR 检测结果显示, *TaS/TK* 在小麦茎、叶中均有表达, 但在根中低水平表达; *TaS/TK* 在抗病小麦、感病小麦中均受条锈菌诱导表达, 但在抗病材料中表达水平明显高于感病材料; 同时, *TaS/TK* 受水杨酸诱导上调表达。以上结果表明 *TaS/TK* 可能参与小麦 SA 信号通路中对条锈病菌的抗性反应。

**关键词:** 小麦; 条锈病; 丝氨酸苏氨酸激酶基因; 实时定量 PCR

**中图分类号:** S512.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)05-0980-07

## Cloning and expression analysis of a Serine/Threonine protein kinase gene *TaS/TK* in wheat in response to stripe rust fungal infection

JIANG Zheng-ning, BIE Tong-de, ZHAO Ren-hui, GAO De-rong, WU Xu-jiang, ZHANG Bo-qiao

(Key Laboratory of Wheat Biology and Genetic Improvement on Low & Middle Yangtze River Valley Winter Wheat Region, Ministry of Agriculture/Institute of Agricultural Science of the Lixiahe District in Jiangsu Province, Yangzhou 225007, China)

**Abstract:** In this study, using an up-regulated EST screened by gene chip as probe, a stripe rust resistance-related gene *TaS/TK* was cloned from wheat, and the gene sequence features, evolutionary relationships and expression characteristics were analyzed. The full-length cDNA sequence of *TaS/TK* is 1 582 bp in length, containing a 1 239-bp open reading frame (ORF), a 139-bp 5' UTR and a 240-bp 3' UTR. *TaS/TK* was predicted to encode a protein of 412 amino acids with a molecular mass of 47 120 and an isoelectric point (*pI*) of 5.84, and was located on chromosome 5B. SMART analysis revealed this putative protein (*TaS/TK*) only possessed the activities of the serine/threonine kinase. Phylogenetic analysis

showed that *TaS/TK* was lowly homologous to the orthologous genes from rice, maize and barley, and the highest similarity (59%) was to that from *Brachypodium distachyon*. Real time quantitative PCR exhibited low expression of *TaS/TK* in roots but high in stems and leaves. *TaS/TK* was obviously responsive to stripe rust pathogen, and presented rather higher expression in resistant materials than in susceptible materials. Furthermore, the transcription level of *TaS/TK* was strongly induced by salicylic acid (SA). These results imply that *TaS/TK* might be involved

收稿日期: 2016-03-01

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0101802); 江苏省自然科学基金项目 (BK20140500); 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(14)5080]

作者简介: 蒋正宁 (1979-), 男, 江西乐平人, 博士, 助理研究员, 研究方向为小麦分子遗传学。(Tel) 13665219751; (E-mail) znjiang79@aliyun.com

通讯作者: 张伯桥, (E-mail) zqb@wheat.org.cn.

in the SA-dependent stripe rust resistance responding gene network in wheat.

**Key words:** wheat; stripe rust; Serine/Threonine kinase gene; real time quantitative PCR(qRT-PCR)

小麦条锈病是小麦重要病害之一,防治该病害最经济有效的措施是培育抗条锈品种。然而,由于小麦条锈病菌具有高度的遗传变异性,加上目前生产上小种专化抗病品种的单一化大面积种植,导致致病力更强的新病菌小种的产生和发展,最终导致原有品种抗性的丧失<sup>[1]</sup>。因此,挖掘抗病相关基因,解析小麦与条锈病菌之间的互作关系及分子机理,揭示寄主植物的抗病机制和病原物的致病机理,对于合理利用小麦抗条锈病基因以及小麦条锈病的可持续防治具有重要的理论指导和实践意义。

丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(S/TK)是生物酶中的一个大家族,众多研究表明,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶参与蛋白质的磷酸化作用,在细胞间的信号传递过程中起作用<sup>[2]</sup>。目前已在很多植物中分离到蛋白激酶,如玉米<sup>[3-4]</sup>、拟南芥<sup>[5]</sup>、豌豆<sup>[6]</sup>、小麦<sup>[7-8]</sup>、紫花苜蓿<sup>[9]</sup>、番茄<sup>[10]</sup>、烟草<sup>[11]</sup>、大豆<sup>[12]</sup>、水稻<sup>[13-14]</sup>和梨<sup>[15]</sup>等,这些蛋白激酶的磷酸化过程被证实参与到许多信号传导途径,包括光、高盐、激素、干旱、营养匮乏及低温分子应答等。其中,水稻抗白叶枯病基因 *Xa21*<sup>[16]</sup>、番茄抗假单孢菌基因 *Pto*<sup>[17]</sup>、小麦抗叶锈病 *Lr10* 基因<sup>[18]</sup>、大麦的抗锈病基因 *Rpg1*<sup>[19]</sup>和簇毛麦抗白粉病基因 *stpk-v*<sup>[20]</sup>等都含有丝氨酸/苏氨酸类蛋白激酶结构域,这些研究结果表明丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶基因在植物抗病途径中也发挥重要作用。

前期利用基因芯片从小麦/条锈病菌互作的差异表达基因中多次筛选到含丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域基因探针。本研究以该探针为基础进一步从小麦中获得丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶基因 *TaS/TK*,利用生物信息学软件分析其编码的氨基酸序列和蛋白质结构特征以及染色体位置,并利用 qRT-PCR 技术分析其在生物及非生物胁迫下在小麦不同组织器官中的表达特征,探讨其在小麦与条锈菌互作及信号应答中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

植物材料:携带 *Yr26* 基因的抗条锈病小麦品种 92R137 由本实验室鉴定和保存,感条锈病小麦品种

扬麦 158 由本实验室引进保存。

供试病毒和菌种:供试条锈病菌条中 32 号(CYR32)小种由西北农林科技大学植保学院植物与病原菌互作实验室提供。大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 $\alpha$  由本实验室保存。

### 1.2 试验方法

1.2.1 小麦幼苗的培育、条锈病菌诱导和组织特异性表达分析 按康振生等<sup>[21]</sup>的方法进行小麦幼苗的培育和条锈病菌接种。接种后将幼苗黑暗保湿 24 h 后,18 h/6 h 光/暗周期培养,分别在接种 0 h、6 h、12 h、18 h、24 h、48 h 和 72 h 时取样,以涂抹无菌水的小麦叶片为对照。在温室种植小麦 92R137,待生长至 4 周左右,取其根、茎和叶用于基因的组织特异性表达分析。

1.2.2 小麦幼苗激素诱导表达分析 在小麦苗期(1叶1心期),在相互隔离的塑料盒子中分别喷施水杨酸(SA,2 mmol)、乙烯(ET,100  $\mu$ mol)、脱落酸(ABA,100  $\mu$ mol)、茉莉酸甲酯(MeJA,100  $\mu$ mol)和双氧水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,7 mmol)处理小麦叶片。分别在喷施激素处理 0 h、0.5 h、2 h、6 h、12 h 和 24 h 取样,以喷施清水为对照。所有处理小麦样品剪取后迅速置液氮中,-80  $^{\circ}$ C 冰箱保存,提取 RNA,所有处理均设 3 次生物学重复。

1.2.3 DNA 及总 RNA 的提取与 cDNA 合成 采用 CTAB 法提取小麦基因组 DNA(gDNA)。采用 Trizol 试剂(Invitrogen)提取各处理材料的总 RNA,并进行总 RNA 完整度检测、运用 NanoDrop1000 紫外分光光度计检测其浓度和纯度。第 1 链 cDNA 的合成按照 TaKaRa 公司的 AMV 反转录试剂盒操作说明进行。

1.2.4 *TaS/TK* 的全长 cDNA 克隆及序列分析 以小麦 92R137 经条锈病菌诱导后的 mRNA 为试验组,92R137 未诱导的及感病小麦条锈病菌诱导后的 mRNA 为对照组进行小麦基因芯片分析,筛选获得 1 个上调表达的 *S/TK* 类基因片段探针 Ta.941.1.A1\_at,以此探针序列为基础设计引物 Ta.941.1.A1\_at-F、Ta.941.1.A1\_at-R(表 1)扩增小麦 92R137 的 cDNA 同源片段,序列比对分析一致后,再以此序列设计 RACE 引物 5'RACE、3'RACE(表 1),通过 SM-

ART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 方法克隆基因 5' 和 3' cDNA 片段。片段拼接后设计全长引物 QC-F、QC-R (表 1), 以 92R137 经条锈病菌诱导后的 cDNA 为模板克隆基因全长 cDNA。

基因的 cDNA 及 gDNA 测序由华大基因公司完成, cDNA 序列在 GenBank 进行 BLAST 搜索, 进行同源性比较。cDNA 序列的初步分析以及氨基酸翻译使用 DNAMAN 软件, 氨基酸序列的比对分析采用 Clustal W2 软件, 进化树分析采用 MEG4.0 软件, 蛋白质氨基酸序列以及结构的分析采用 SMART 软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/smart/>)。

1.2.5 基因染色体定位分析 根据获得的基因组全长基因, 设计特异引物 TaS/TK-F, TaS/TK-R (表 1), 以小麦 1 套染色体缺体/四体的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 对基因进行小麦染色体定位

表 1 本研究所涉及引物

Table 1 The primers used in this study

引物名称	序列(5'→3')	备注
Ta.941.1.A1_at-F	AGCATGGATCTTGGGGTTC	EST 探针引物
Ta.941.1.A1_at-R	TGGGTGCCGTAGTCATACAA	
5'RACE-F	GTCCTCATGGTGGACTCGT	基因 RACE 引物
3' RACE-R	TTGTTATCAGGGCCTGTTCC	
QC-F	GGGGTAGCTATGCCAGACAA	全长扩增引物
QC-R	AGCAAACCTGAGTAGTTCCA	
RT-F	GGGATTCGGCCATTACGG	qRT-PCR 分析引物
RT-R	CTGCTCCGTCGCCTTCAA	
TaEF-1α-F	TGGTGTCAATCAAGCCTGCTATGGT	qRT-PCR 分析内参引物
TaEF-1α-R	ACTCATGGTGCATCTCA ACGGACT	
UPM	Long: CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGCTATCAACGCAGACT Short: TAATACGACTCACTATAGGGC	5'RACE 通用引物
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTT	3'RACE 接头锚定引物
TaS/TK-F	GGTTTGAATTATCTTCATAATGC	染色体定位分析引物
TaS/TK-R	CTTCCACAATCGCGGTACCTCTG	

## 2 结果与分析

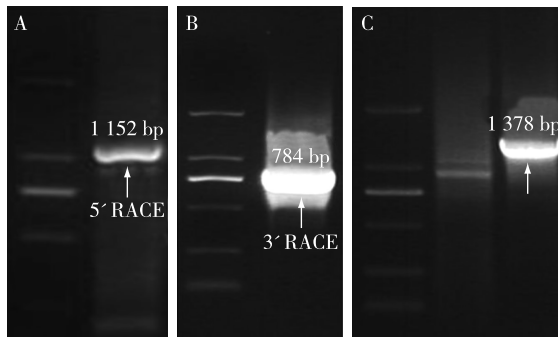
### 2.1 TaS/TK 基因的克隆和蛋白质结构

以筛选获得的上调表达 EST 探针 Ta.941.1.A1\_at 设计引物, 从小麦 cDNA 中扩增, 经测序, 与 EST 探针一致性 100%, 为同一基因序列, 因此继续以该 EST 序列设计 5' RACE 引物与 RACE 通用引物 (UPM, 表 1), 经 RT-PCR 获得 5'-RACE 片段 1 152 bp (图 1A), 以 3' RACE 引物与 3' 锚定引物 (AP, 表 1) 获得 3'-RACE 片段 784 bp (图 1B)。将

分析。

1.2.6 实时定量 PCR 分析 根据 TaS/TK 的 cDNA 序列设计定量 PCR 引物 RT-F、RT-R (表 1), 小麦延伸因子 TaEF-1α 作为内参 (TaEF-1α-F, TaEF-1α-R, 表 1)。采用 ABI PRISM 7500 实时定量 PCR 仪以取样的各个时间点的 cDNA 为模板进行 TaS/TK 的 real-time PCR 扩增。反应体系为 0.5 μl 50× SYBR Green, 0.1 μl ROX, 1.0 μl 10×cDNA, 2.5 μl 10×Taq buffer, 2.50 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.16 mmol/L dNTP, 0.20 μmol/L 引物, 补水至总体积 25.0 μl。反应程序为 95 ℃ 1 min; 95 ℃ 10 s, 61 ℃ 20 s, 72 ℃ 40 s, 40 个循环。反应结束后分析荧光值变化曲线和融解曲线, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测确认扩增产物。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法<sup>[11]</sup> 分析试验数据, 确定基因的相对表达量。每个反应重复 3 次, 取平均值。

扩增片段凝胶电泳后切胶回收、连接 PMD-18T 载体、转化 E.coli DH5α、选取阳性克隆测序、拼接后得到 1 582 bp 的片段, 全长序列经 ORF finder 分析包含 1 239 bp 的 ORF 基因编码区、139 bp 的 5'UTR 以及 240 bp 的 3'UTR。在 ORF 两端设计全长引物, 获得预期长度片段 (图 1C), 测序分析与拼接序列一致。将该 ORF 经 NCBI blastX 分析, 该克隆为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族基因, 因此将该基因命名 TaS/TK, TaS/TK 基因编码 412 个氨基酸, 预测分子质量为 47 120, 等电点 5.84。



A: 5' RACE 扩增结果; B: 3' RACE 扩增结果; C: 基因全长引物扩增结果。

图1 *TaS/TK* 基因的 PCR 扩增

Fig.1 *TaS/TK* amplified by PCR

## 2.2 *TaS/TK* 蛋白质的结构域及同源性

利用 SMART 软件对 *TaS/TK* 进行蛋白结构分析,发现 *TaS/TK* 仅含有 1 个丝氨酸/苏氨酸激酶结

构域(S/TKc)(27~305 aa)。利用 TMHpred 及 SignalP 对 *TaS/TK* 进行跨膜和信号肽结构域预测,均无信号,表明 *TaS/TK* 仅含有 1 个丝氨酸/苏氨酸激酶保守结构域,但是没有胞外域和跨膜结构。

由于不同的 *S/TK* 类基因的保守性在于激酶域,而其他区域的同源性很低,因此,采用 *S/TK* 的激酶域在 NCBI 的 nr 蛋白质数据库中进行 BlastP 搜索,找出其他物种中的同源基因,利用 ClustalW2 软件对不同物种中的同源蛋白激酶结构域进行比较分析。结果表明典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶保守的亚结构域(subdomain),包括 I 亚结构域(GQG-GYGSV)、II 亚结构域(AVK)、丝氨酸/苏氨酸底物专一性蛋白质激酶催化中心的 VIIb 亚结构域(DIKASNILL)、VII 亚结构域(DFG)、底物识别区的 VIII 亚结构域(GTFGYLAPE)(图 2,下划线标出)在 *TaS/TK* 中也存在。3 个保守的磷酸化活性位点分

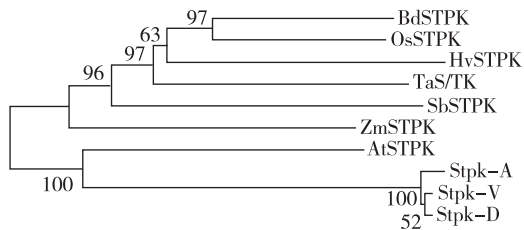
TaS/TK	FSDDRIIGKGGFGVYKGVLDNGEEIALKKLN--HTGLDDKEFTN	EFNNIIRAHHQNIVQ	58	
BdSTPK	FSKEHIIGSGWYGVYKGVLENDEEIAIKKLHN-MVGLDDTQFRN	EFNNLMRAQHQNITR	59	
OsSTPK	FSEEHKVGSGGYGVYKGVLENTEIAIKKLHQ-MVGLDDVQFKK	EFNNLMRVQHKNIIG	59	
HvSTPK	FSEKNIIGRGACGVYKGVLDNGEEIAVKKLHQ-TLSIDDGLFKK	EVNNVMRAEHKNIVR	59	
Stpk-V	FNPSNKIIGEGFGSVYKGRLRNGKLI	AVKVLVS-ESRQGLKEFLN	ELMSISNISHGNLVS	59
AtCRK16	FQSKNKLGHGGFG---EGTFPNGTEVAVKRLSK-ISGQGEEEFKN	EVLLVAKLQHRNLVR	56	
	I	II	*	
TaS/TK	FVGICYHPGTSMIMHDGQYIFAHEPIRILCFEYLHGGNLESLLSDEQP--CRPDWQTCYK		116	
BdSTPK	LVGYCYHQGHERMKYNGEYIFAHEVERVLCFEYLQGGSLDKYISDES---RGLDWCTRYK		116	
OsSTPK	LVGYCYEIRHKHIKVDGDYHFSRMEERALCFEYLHRGSLDKYLSDET---CGLDWHTRYK		116	
HvSTPK	LVGYCHHISPIIVEHEGKHVSASVIERVICFEYMQRGSLDDQLSAES---CKLDWDRCYK		116	
Stpk-V	LYGYCVEGN-----QRILVYNYLENNSLAQTLGSGRSNIQFNWRSRVN		103	
AtCRK16	LLGFSVEGE-----EKILVYEYMPNKSLDYFLFDHRR-RGQLDWRTRYN		99	
TaS/TK	IIKGVSQLN-YLHNA-HEESIYHLDLKPANVLLDNNMIPKIGDFGISRIFSLTKT-ITT		173	
BdSTPK	NIKGVCEGLKNYLHNG-YKDP IYHMDLKPANILLDKDMTLKIGDFGLSRLFPSANT-FTT		174	
OsSTPK	IIKGICEGLD-YLHNGRPEDQIVHLDLKPANILLDENKMPKIADFGLSRLFGSTQT-FTT		174	
HvSTPK	IIKGICEGLH-YLHNA--VPPIYHGLDKPGNILLDKDMVAKIGDFGLSRVFDTTQTYMTT		173	
Stpk-V	ICLGIARGLA-YLHDD-VNPHIVHRDIKASNILLDKDLTPKISDFGLAKLLPPNAS-HIS		160	
AtCRK16	IIRGVTRGIL-YLHQD-SRLTIIHRDLKAGNILLDVMNPKIADFGVARNFRVDQT-EAT		156	
	VIIb*	VII		
TaS/TK	ATRMGTLGYMPPEYINK-QEISPKYDVFSLGAVVIQIMAGRQRYR-----C		220	
BdSTPK	IK-IIGTPGYMPPEYIEK-HEITPKFDVFSLGVIIRVVAGDEGYSK-----S		220	
OsSTPK	RT-FIGTVGYMPPEYIER-RHISMKFDVFSLGVIIEIMAGQSGRST-----S		220	
HvSTPK	SGVIKGTGPGYMSPEYINE-HKISLSDVFALGVIIEIKMMTGKEDYSN-----Y		220	
Stpk-V	T-RVAGTLGYLAPEYAIR-GQVTRKSDVYSFGVLLLEIVSGRSNTSSRLPYEDQILLEKF		218	
AtCRK16	TGRVVGTFGYMPPEYVAN-GQFSMKSDVYSFGVLILEIIVGKKSSS-----FHEID		206	
	VIII			

下划线标出的是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的几个保守亚结构域(Subdomain),阴影及星号标出的是 3 个磷酸化催化位点。

图2 *TaS/TK* 及不同物种 *S/TK* 激酶结构域分析

Fig.2 Alignment of conserved domain of *TaS/TK* and its homologs in other plants

别位于 *TaS*/*TK* 第 70 位的谷氨酸(E)、第 167 位的天冬氨酸(D)、第 169 位的赖氨酸(K)(图 2,阴影及星号标出)。利用 MEGA4.0 软件对搜索到的蛋白进行激酶区的分析及系统进化树的构建,结果显示, *TaS*/*TK* 与其他禾本科作物包括拟南芥、大麦、短柄草、水稻、玉米、高粱 6 个物种的激酶基因同源性较低(同源性 48%~59%),与同源性最高的短柄草 *BdSTPK*(XM\_003559022.1)也仅为 59%(图 3)。*TaS*/*TK* 与已知小麦中克隆的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶同源性更低,因此, *TaS*/*TK* 为 1 个新的未知丝氨酸/苏氨酸激酶基因。



其他物种 *S*/*TK*(GeneBank 登录号),短柄草 *STPK*:*BdSTPK* (XM\_003559022.1);水稻 *STPK*:*OsSTPK* (AK243235.1);大麦 *STPK*:*HvSTPK* (AF509747.1);高粱 *STPK*:*SbSTPK* (XM\_002442108.1);玉米 *STPK*:*ZmSTPK* (NM\_001175969.1);小麦 *STPK*:*Stpk-A* (AK335769);小麦 *STPK*:*Stpk-D* (AEF30547.1);簇毛麦 *STPK*:*Stpk-V* (HM241655.1);拟南芥 *STPK*:*AtSTPK* (NM\_118453.1)。

图 3 *TaS*/*TK* 与其他物种 *S*/*TK* 在激酶结构域上的同源性分析  
Fig.3 Phylogenetic analysis of *TaS*/*TK* and its homologs in the kinase domain

### 2.3 *TaS*/*TK* 基因的染色体定位

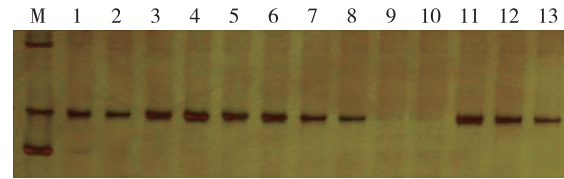
根据 *TaS*/*TK* 序列设计特异引物(*TaS*/*TK*-F, *TaS*/*TK*-R,表 1),以 1 套中国春缺体/四体的基因组 DNA 为模板进行扩增,结果表明在缺失 5B 染色体的缺体/四体材料(N5B/T5A, N5B/T5D)中缺失了目标条带(图 4),因此 *TaS*/*TK* 定位于 5B 染色体上。

### 2.4 *TaS*/*TK* 基因组织特异性表达

定量 RT-PCR 结果显示, *TaS*/*TK* 在叶、根、茎等组织中均表达,表达量在叶部最高,茎部次之,根部最少,约为叶部表达量的三分之一(图 5)。

### 2.5 *TaS*/*TK* 基因生物和非生物胁迫诱导表达

利用能特异扩增 *TaS*/*TK* 基因的引物(RT-F、RT-R,表 1),通过定量 RT-PCR 分析 *TaS*/*TK* 基因受条锈病菌诱导表达特征。结果显示 *TaS*/*TK* 在抗病小麦(92R137)、感病小麦中均受小麦条锈病菌的诱导,但抗病小麦表达显著强于感病小麦(图 6)。



Marker:标准分子量;1:N4A/T4B,缺 4A 添加 4B 系;2:N4A/T4D,缺 4A 添加 4D 系;3:- N4B/T4A,缺 4B 添加 4A 系;4:N4B/T4D,缺 4B 添加 4D 系;5:N4D/T4A,缺 4D 添加 4A 系;6:N4D/T4B,缺 4D 添加 4B 系;7:N5A/T5B,缺 5A 添加 5B 系;8:N5A/T5D,缺 5A 添加 5D 系;9:N5B/T5A,缺 5B 添加 5A 系;10:N5B/T5D,缺 5B 添加 5D 系;11:N5D/T5A,缺 5D 添加 5A 系;12:N5D/T5B,缺 5D 添加 5B 系;13:中国春。

图 4 中国春缺体/四体材料对 *TaS*/*TK* 基因的染色体定位

Fig.4 Physical mapping of *TaS*/*TK* using Chinese Spring nulli-tetrasomic lines

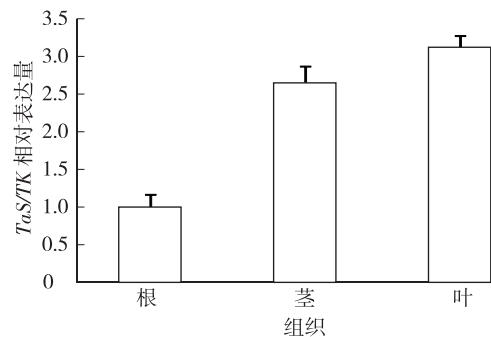


图 5 *TaS*/*TK* 在小麦不同组织中的表达模式

Fig.5 Transcription pattern of *TaS*/*TK* in different wheat organs

在 92R137 与条锈病菌 CYR32 的非亲和组合中, *TaS*/*TK* 被迅速诱导表达, 6~36 h 呈逐渐增强趋势,36 h 达到最大,为对照的 11 倍,之后有所下降,但仍维持高水平表达量。而在感病小麦与条锈菌亲和组合中, *TaS*/*TK* 早期受到一定的抑制,24 h 之后才有一个明显上调的表达,为对照的 3 倍,说明 *TaS*/*TK* 在条锈病菌侵染早期的高水平表达与抗病反应密切相关。

为了检测 *TaS*/*TK* 基因对不同信号的响应情况,分析其可能参与的信号通路,本研究用不同激素处理一叶期的 92R137 叶片,在不同时间段取样提取 RNA,用定量 RT-PCR 对该基因进行表达特征分析,结果显示, *TaS*/*TK* 基因受 SA 诱导上调表达,诱导后 12 h 表达量达到峰值,表达上调了 11.8 倍; ETH、MeJA 和 ABA 诱导也有微弱的上调作用,分别在诱导后 6 h、2 h 和 12 h 达到表达峰值,上调倍数

分别为诱导前 3.6 倍、2.3 倍和 2.8 倍。 $H_2O_2$  诱导后 2 h 表达量达到峰值,表达量上调 6.7 倍(图 7)。*TaS/TK* 基因的表达主要受到 SA 的诱导上调表达,同时也受到 ETH、MeJA、ABA 及  $H_2O_2$  信号分子的影响,推测该基因可能通过 SA 介导的信号通路参与对条锈病菌的抗性反应。

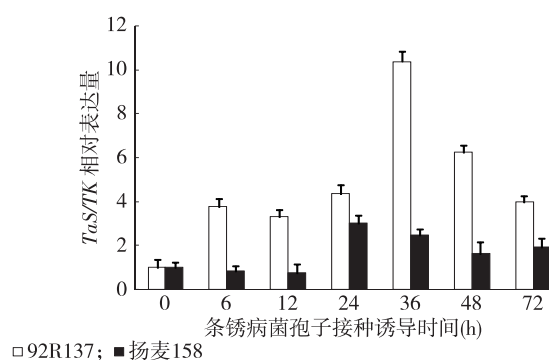


图 6 *TaS/TK* 在 92R137 和扬麦 158 中受条锈病菌诱导表达模式

Fig.6 Transcription pattern of *TaS/TK* in 92R137 and Yangmai158 at different post-inoculation time points

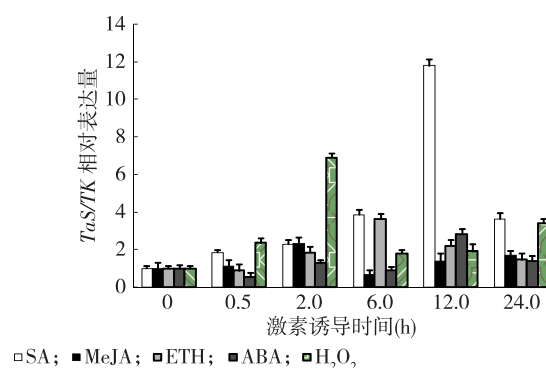


图 7 *TaS/TK* 在不同外源植物激素诱导下的表达量

Fig.7 Analysis of the expression of *TaS/TK* induced by different exogenous phytohormones

### 3 讨论

丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶基因普遍存在于植物中,拟南芥的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族现已发现 57 个成员,其中已被证实参与拟南芥对盐、高渗、脱落酸、水杨酸、寒冷和热胁迫应答过程的有 23 个<sup>[22]</sup>。小麦中也有多个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶基因被克隆并作初步功能研究,如参与小麦的耐盐反应基因 *TaSTK*<sup>[23]</sup>,小麦抗叶锈病基因 *Lr10*<sup>[19]</sup> 等。本研究克隆的 *TaS/TK* 编码蛋白含 412 个氨基酸,

分子量 47 120,仅存在 1 个典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶保守的亚结构域,无胞外和跨膜结构域。经激酶区 Blastp 比对分析,*TaS/TK* 与小麦及其他植物已克隆的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶同源性较低,同源性最高的短柄草,也仅为 59%。与簇毛麦抗白粉病基因 *stpk-v* 除激酶区保守结构域基序相同外,在序列长度及结构上也存在很大差异,因此,*TaS/TK* 为 1 个小麦中尚未鉴定的新的丝氨酸/苏氨酸激酶基因。

在动物和酵母中的激酶多数是酪氨酸蛋白激酶,其中有一部分激酶能识别外来的信号分子并传导信号,引发一系列级联反应,产生免疫应答。植物 *S/TK* 在抗病中的作用可能与此类似。如水稻 *R* 基因 *Xa21* 编码的蛋白包括一个受体区 LRR 和一个丝氨酸/苏氨酸激酶区,在发挥抗病作用时直接和受体相联,引发下一步的信号传导和防卫反应<sup>[12]</sup>;番茄抗病基因 *Pto* 也是 1 个丝氨酸/苏氨酸激酶基因,后来的研究发现它发挥抗病作用必须有 *Prf* 基因的协同参与,*Prf* 是 1 个 NBS-LRR 类抗病基因<sup>[13]</sup>。本研究克隆的 *TaS/TK* 基因也属于丝氨酸/苏氨酸激酶家族基因,并且存在 1 个典型的丝氨酸/苏氨酸激酶的保守区域,但没有胞外域和跨膜结构域,如果 *TaS/TK* 同样在抗病过程中发挥作用,其可能也必须同其他基因互作,共同参与抗病反应。

植物在长期的进化过程中已经形成了一套复杂的机制来抵御病原菌的侵袭,植物通过信号感知病原菌并迅速启动防卫反应抗性机制,达到抗病的目的。植株受到病原菌入侵后,产生活性氧物质,并在体内迅速获得积累,这种累积作用持续时间较长。活性氧物质可作为初级信号分子,将介导产生次级信号分子如水杨酸(Salicylic acid, SA)、乙烯(Ethylene, ET)和茉莉酸(Jasmonic acid, JA)等。因此,SA、ET、JA 是植物感知病原菌的主要信号途径<sup>[24]</sup>。植物通过这些信号途径在激活抗病防卫反应过程中,蛋白激酶起着重要作用,蛋白激酶通过磷酸化级联反应将病原菌信号传递到核内,从而激活防卫反应基因的表达。尽管蛋白激酶家族在植物抗病反应中参与了众多的抗病途径,但每一个成员所扮演的角色各不相同。本研究通过条锈病菌和激素处理对 *TaS/TK* 基因进行表达谱分析,发现 *TaS/TK* 基因主要受到 SA 和条锈病菌的诱导上调表达,同时也受到 ABA 及  $H_2O_2$  信号分子的影响,推测该基因可能

通过SA介导的信号通路参与对条锈病菌的抗性反应。

小麦材料92R137含抗条锈病基因 $Yr26$ ,且该基因定位于小麦染色体1BS上<sup>[25]</sup>,而 $TaS/TK$ 定位于5B,显然不是 $Yr26$ 本身,但本研究发现 $TaS/TK$ 在含 $Y26$ 的抗病小麦品种中受条锈菌及SA诱导高水平表达,因此,我们推测 $TaS/TK$ 属于依赖SA响应基因调控网络,参与 $Yr26$ 介导的抗条锈病反应,但该基因是否在其他抗条锈病基因(如 $Yr36$ )介导的抗病反应中起同样作用,还有待进一步研究。本研究仅基于 $TaS/TK$ 基因的克隆和表达特征进行分析,该基因的生物学功能还有待通过病毒诱导的基因沉默或单细胞瞬间表达技术进一步验证。

### 参考文献:

- [1] WAN A M, ZHAO Z H, CHEN X M, et al. Wheat stripe rust epidemic and virulence of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [J]. *Plant Disease*, 2004, 88(8): 896-904.
- [2] SHARMA A, KOMATSU S. Involvement of  $Ca^{2+}$ -dependent protein kinase component downstream to the gibberellin-binding phosphoprotein, Rubis CO activase, in rice [J]. *BBRC*, 2002, 290(2): 690-695.
- [3] WALKER J C, ZHANG R. Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoprotein of Brassica [J]. *Nature*, 1990, 345(627): 743-746.
- [4] 邹晓威, 王娜, 刘芬, 等. 玉米抗病相关基因在玉米与玉米丝黑穗病菌、玉米黑粉病菌互作过程中的表达差异分析 [J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(11): 150-152.
- [5] FERREIRA P C, HEMERLY A S, VILLARROEL R, et al. The Arabidopsis functional homolog of P34cdc2 protein kinase [J]. *Plant Cell*, 1991, 3(5): 531-540.
- [6] LIN X, FENG X H, WATSON J C. Differential accumulation of transcripts encoding protein kinase homologs in greening pea seedling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(16): 6951-6955.
- [7] ANDERBERG R J, WALKER S M K. Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(21): 10183-10187.
- [8] 张照贵, 李冰, 王佳佳, 等. 小麦  $SnRK2.2$  基因克隆、表达载体构建及转化 [J]. *山东农业科学*, 2014, 46(11): 1-7.
- [9] PAY A, JONAK C, BOGRE L, et al. The Ms K family of alfalfa protein kinase genes encodes homologues of shaggy/glycogen synthase kinase3 and shows differential expression patterns in plant organs and development [J]. *Plant Journal*, 1993, 3(6): 847-856.
- [10] MARTIN G B, BROMMONSCHENKEL S H, CHUNWONGSE J, et al. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato [J]. *Science*, 1993, 262(5138): 1432-1436.
- [11] ITO Y, BANNO H, MORIBE T, et al. NPK15, a tobacco protein-serine/threonine kinase with a single hydrophobic region near the amino terminus [J]. *Mol Gen Genet*, 1994, 245(1): 1-10.
- [12] ZHANG C, ZHAO H, LIU Y, et al. Isolation and characterization of a novel glycogen synthase kinase gene, Gm GSKin Glycine max L. that enhances abiotic stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(6): 861-866.
- [13] 董海涛, 吴玉良, 程志强, 等. 差异显示法克隆水稻抗白叶枯病相关蛋白激酶基因 [J]. *浙江大学学报*, 1998, 24(5): 548-552.
- [14] 赵丽, 张国嘉, 郑世刚, 等. 水稻类受体蛋白激酶  $OsESG1$  的原核表达 [J]. *山东农业科学*, 2015, 47(1): 1-5.
- [15] 许园园, 李晓刚, 李慧, 等. 梨  $CDPK$  基因家族全基因组序列鉴定分析 [J]. *江苏农业学报*, 2015, 31(3): 659-666.
- [16] SONG W Y, WANG G L, CHEN L, et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene,  $Xa21$  [J]. *Science*, 1995, 270(15): 1804-1806.
- [17] ZHOU J M, TANG X Y, MARTIN G B. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes [J]. *The EMBO Journal*, 1997, 16(11): 3207-3218.
- [18] BRUEGGEMAN R, DRADER T, KLEINHOF S A. The barley ser/thr kinase gene  $rgp1$  providing resistance to stem rust belongs to a gene family with five other members encoding kinase domains [J]. *Theor Appl Genet*, 2006, 114(6): 1147-1158.
- [19] FEUILLET C, SCHACHERMAYR G, KELLER B. Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encoded at the  $Lr10$  disease resistance locus in wheat [J]. *Plant J*, 1997, 11(1): 45-52.
- [20] CAO A Z, XING L P, WANG X Y, et al. Serine/threonine kinase gene  $Stpk-V$ , a key member of powdery mildew resistance gene  $Pm21$ , confers powdery mildew resistance in wheat [J]. *PNAS*, 2011, 108(19): 7727-7732.
- [21] 康振生, 王瑶, 黄丽丽, 等. 小品种对条锈病低反应型麦抗性的组织学和超微结构研究 [J]. *中国农业科学*, 2003, 36(9): 1026-1031.
- [22] RUDRABHATLA P, REDDY M M, RAJASEKHARAN R. Genome-wide analysis and experimentation of plant serine/threonine/tyrosine-specific protein kinases [J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 60(2): 293-319.
- [23] GE R C, CHEN G P, SHEN Y Z, et al. Cloning and functional characterization of a wheat serine/threonine kinase gene ( $TaSTK$ ) related to salt-resistance [J]. *Plant Science*, 2007, 173(1): 55-60.
- [24] DONG X. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 1998, 1(4): 316-323.
- [25] MA J X, ZHOU R H, DONG Y S, et al. Molecular mapping and detection of the yellow rust resistance gene  $Yr26$  in wheat transferred from *Triticum turgidum* L. using microsatellite markers [J]. *Euphytica*, 2001, 120(2): 219-226.

(责任编辑:陈海霞)