

刘 洋,陈孝月,白裔凡,等. 小麦 TaXI-III 互作蛋白的筛选及其与 TaHRLI-2B 的互作分析[J]. 江苏农业学报,2026,42(7):1326-1337.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2026.07.004

小麦 TaXI-III 互作蛋白的筛选及其与 TaHRLI-2B 的互作分析

刘 洋¹, 陈孝月¹, 白裔凡¹, 陈 微¹, 司红起², 蔡 华¹

(1.滁州学院现代农业与食品工程学院,安徽 滁州 239000; 2.安徽农业大学农学院,安徽 合肥 230000)

摘要: 为探究木聚糖酶抑制剂基因 *TaXI-III* 在小麦抵御禾谷镰刀菌侵染中的分子机制,本研究从小麦品种安农 1589 中克隆出 *TaXI-III* 基因,生物信息学与亚细胞定位分析结果显示,TaXI-III 蛋白定位于细胞膜/细胞壁。通过同源重组法构建诱饵载体,自激活与功能检测结果显示,pBT3N-*TaXI-III* 在 NMY51 酵母细胞内无自激活活性,且可正常表达功能蛋白。利用分裂泛素酵母双杂交系统筛选获得 19 个 TaXI-III 互作候选蛋白,功能涉及信号转导、跨膜运输、细胞程序性死亡及胁迫响应等。进一步通过酵母回转、荧光素酶互补及双分子荧光互补试验,证实 TaXI-III 蛋白与超敏反应(HR)样病变诱导蛋白 TaHRLI-2B 在酵母和植物细胞中互作。逆转录定量实时聚合酶链式反应(RT-qPCR)结果表明,*TaHRLI-2B* 基因受禾谷镰刀菌诱导表达,在拟南芥中过表达 *TaHRLI-2B* 基因可增强植株抗病性。本研究结果为解析 *TaXI-III* 基因功能机制及小麦抗病基因挖掘提供了理论依据。

关键词: 小麦; 木聚糖酶抑制剂 TaXI-III; 分裂泛素酵母双杂交系统; 互作蛋白; 超敏反应(HR)样病变诱导蛋白 TaHRLI-2B

中图分类号: S512.1;S330

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2026)07-1326-12

Screening for TaXI-III interacting proteins in wheat and analysis of its interaction with TaHRLI-2B

LIU Yang¹, CHEN Xiaoyue¹, BAI Yifan¹, CHEN Wei¹, SI Hongqi², CAI Hua¹

(1.School of Modern Agriculture and Food Engineering, Chuzhou University, Chuzhou 239000, China; 2.School of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230000, China)

Abstract: In order to further explore the molecular mechanism of the wheat xylanase inhibitor gene *TaXI-III* in resistance to *Fusarium graminearum*, this study cloned the *TaXI-III* gene from the moderately resistant variety Anong 1589. Bioinformatics and subcellular localization analysis revealed that the TaXI-III protein was localized to the cell membrane/wall. The bait vector was constructed by homologous recombination method. The self-activation and functional assays confirmed that pBT3N-*TaXI-III* had no self-activation activity in NMY51 yeast cells, and could produce functional proteins. A total of 19 candidate proteins that may interact with TaXI-III were finally obtained by split-ubiquitin yeast two-hybrid system from wheat cDNA library. These proteins were associated with diverse biological functions, including signal transduction,

transmembrane transport, programmed cell death, and stress response. Results from yeast retransformation, luciferase complementation assay and bimolecular fluorescence complementation assay confirmed that TaHRLI-2B, an HR-like lesion-inducing protein involved in the hypersensitive response, interacted with TaXI-III in both yeast and plant cells. The expression of *TaHRLI-2B* was induced by *Fusarium graminearum* infection through quantitative

收稿日期:2025-09-23

基金项目:安徽省高校自然科学研究重点项目(2022AH051088);滁州学院科研启动基金项目(2022qd50);安徽省高校自然科学研究重大项目(2023AH040223);国家产业技术体系——小麦体系项目(CARS-03)

作者简介:刘 洋(1991-),男,安徽宿州人,博士,讲师,研究方向为小麦抗病抗逆基因挖掘。(E-mail)97064987@qq.com

通讯作者:蔡 华,(E-mail)chezh@163.com

real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis. And the overexpression of *TaHRLI-2B* in *Arabidopsis thaliana* enhanced the resistance of plants to pathogens. The results of this study provide a theoretical foundation for further exploring the functional mechanism of *TaXI-III* and discovering disease-related genes in wheat.

Key words: wheat; xylanase inhibitor TaXI-III; split-ubiquitin yeast two-hybrid system; interacting proteins; HR-like lesion-inducing protein TaHRLI-2B

全球气候变暖加剧了禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 引起的小麦赤霉病 (*Fusarium head blight*, FHB) 的发生与危害。这种病害不仅会造成小麦 (*Triticum aestivum* L.) 减产和品质下降,其产生的真菌毒素还严重威胁人畜健康^[1]。目前,培育抗病品种是预防和控制赤霉病最经济环保的策略,但是中国主栽小麦品种多数抗病性较差^[2]。小麦赤霉病抗性为多基因控制的数量性状,尽管已鉴定出大量相关数量性状基因座 (QTL),国内育种仍主要依赖 *Fhb1* 单一抗原,遗传基础狭窄,亟需深入解析小麦与病原菌的互作机制,挖掘新的抗病基因,创制抗病新种质^[3]。

植物细胞壁是抵御病原菌入侵的第一道屏障,由纤维素、半纤维素、果胶和蛋白质等构成,形成了复杂的网络结构^[4-5]。为成功感染寄主,禾谷镰刀菌会分泌多种细胞壁降解酶破坏小麦细胞壁结构^[6]。其中,内切- β -1,4-木聚糖酶可切割木聚糖主链的 β -1,4-糖苷键,破坏细胞壁完整性,并诱导活性氧积累与细胞死亡^[7-8]。为应对病原菌侵袭,小麦进化出多种木聚糖酶抑制剂,包括 TaXI、XIP 和 TLXI 3 大类^[9]。TaXI 是小麦中最早鉴定且含量较高的木聚糖酶抑制剂,此编码基因以多基因家族形式存在,目前已分离出 6 种亚型^[9-10]。多项研究结果表明,TaXI 基因表达受病原菌感染诱导。禾谷镰刀菌或白粉菌感染可显著诱导 *TaXI-III/TaXI-IV* 基因转录本积累^[11];接种禾谷镰刀菌突变体 Δ Tri5 可使 TaXI-IA、TaXI-IIA 蛋白表达量提高 2~3 倍^[12];小麦扬花期接种禾谷镰刀菌后,多个 TaXI-type 亚型在抗病品种中的上调幅度显著高于感病品种^[13]。功能研究结果表明,TaXI-III 蛋白在体外可抑制禾谷镰刀菌木聚糖酶 *FGSG_03624* 和 *FGSG_10999* 的活性,并抑制其在未分化小麦细胞、小麦外稃组织及烟草叶片中引发的细胞死亡^[13-16]。其他 TaXI-type 亚型在毕赤酵母中异源表达时也表现出类似功能^[13]。由于 TaXI-III 蛋白对禾谷镰刀菌木聚糖酶具有双重抑制效应,转 *TaXI-III* 基因硬质小麦在接种禾谷镰刀菌后赤霉病病症和菌体生物量显著减轻^[14]。

尽管 TaXI 功能已有较多研究,其互作蛋白尚未系统鉴定,且其抑制木聚糖酶诱发细胞死亡的分子机制仍不明确。为此,本研究以 TaXI-III 为诱饵,利用酵母双杂交系统筛选禾谷镰刀菌感染的小麦穗部 cDNA 文库,鉴定互作蛋白,并对候选蛋白的生物学功能进行初步分析,以进一步揭示 *TaXI-III* 介导的抗病机制,为小麦抗赤霉病基因挖掘提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试小麦为中抗赤霉病品种安农 1589,种植于滁州学院小麦生长室,于扬花期对每朵小花注射 10 μ L 禾谷镰刀菌(混合菌株,由安徽农业大学农学院提供),并于接种后 0 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72 h 和 96 h 取样,液氮速冻后于 -80 $^{\circ}$ C 保存。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 种植于滁州学院植物培养室。

酵母双杂交试验所需载体及禾谷镰刀菌感染的小麦 cDNA 文库由安徽农业大学小麦分子育种实验室惠赠,植物表达载体 pHZM27-GFP、pCAMBIA1300-nLUC、pCAMBIA1300-cLUC、pUC-SPYCE 和 pUC-SPYNE 由滁州学院小麦育种实验室保存。试验所需感受态细胞均购自上海唯地生物技术有限公司。

RNA 提取试剂盒(货号:RC401-01)、反转录试剂盒(货号:R123-01)、Phanta 高保真酶(货号:P525-01)和荧光定量 PCR 试剂盒(货号:Q412-02)均购自南京诺唯赞生物科技有限公司;同源重组试剂盒(货号:CU202-02)、胶回收试剂盒(货号:EG101-01)、质粒提取试剂盒(货号:EM111-01)和 DNA marker(货号:BM141-01、BM101-01)均购自北京全式金生物技术股份有限公司;酵母营养缺陷型培养基(货号:PT1056、PT1066)、酵母感受态制备试剂盒(货号:PT1354-DC)、X-gal(货号:PY1092)均购自武汉普因特生物工程有限公司;酵母质粒提取试剂盒(货号:D3376)购自北京索莱宝科技有限公司;

限制性内切酶购自新英格兰生物实验室;引物合成和测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 *TaXI-III* 基因的克隆

为克隆 *TaXI-III* 基因,从接种禾谷镰刀菌不同时间点的安农 1589 小麦穗部提取总 RNA,反转录获得 cDNA,并作为模板。以特异性引物 *TaXI-III*-F (5'-CCTGACCATCTCCGTCCACT-3') 和 *TaXI-III*-R (5'-TAGTCGACGAAGTACATTGTACAGTA-3') 为扩增引物,利用 Phanta 高保真酶完成 PCR 扩增。扩增体系和程序参考说明书。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收纯化,连接至 pBlunt 克隆载体后测序验证。选取测序正确的阳性克隆,从中提取 pBlunt-*TaXI-III* 质粒,于 -20 °C 保存备用。

1.3 生物信息学分析 *TaXI-III* 蛋白及其亚细胞定位

使用在线网站 Cell-PLoc 2.0(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>)、CELLO v.2.5(<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) 和 DeepLoc - 2.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepLoc-2.0/>) 对 *TaXI-III* 蛋白进行亚细胞定位预测。利用同源重组法构建 pHZM27-*TaXI-III*-EGFP 定位表达载体:以 pBlunt-*TaXI-III* 为模板,使用引物 pHZM27-*TaXI-III*-F (5'-AGAGGACACGCTCGAGATGGCAGGGCTCCTCCTCC-3')/pHZM27-*TaXI-III*-R (5'-CCATGAGCTCCCTAGGGCTGCCGCAACCCGTAAAGT-3') 扩增目的片段,纯化后通过同源重组试剂盒与经 *Xho* I 和 *Spe* I 双酶切的 pHZM27-*GFP* 载体连接。将重组产物转化至大肠杆菌 DH5 α 中,经菌液 PCR 及 *Xho* I 和 *Spe* I 双酶切重组质粒筛选阳性克

隆,对酶切正确的质粒进行测序验证。将 pHZM27-EGFP 与 pHZM27-*TaXI-III*-EGFP 分别转化农杆菌 GV3101,经 PCR 鉴定后,于 YEB 培养基中 28 °C 培养至 OD_{600} 为 1.2~1.6。菌体用悬浮液 (10 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L 2-吗啉乙磺酸、100 μ mol/L 乙酰丁香酮) 洗涤并重悬至 $OD_{600} \approx 0.8$,28 °C 避光静置 2~3 h 后注射本氏烟草叶片。避光培养 48 h 后,取侵染组织进行共聚焦显微镜观察。

1.4 诱饵载体的构建、酵母转化及功能与自激活检测

根据 *TaXI-III* 基因编码区序列及诱饵载体序列,使用 SnapGene 软件设计同源重组引物(表 1)。以 pBlunt-*TaXI-III* 质粒为模板,用表 1 中引物进行 PCR 扩增,回收基因片段后分别与经相应酶切线性化的 pBT3-N (*Sfi* I/*Nco* I)、pBT3-STE (*Sfi* I/*Pst* I) 和 pBT3-SUC (*Sfi* I/*Pst* I) 载体进行重组连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经菌液 PCR、双酶切和测序验证后获得重组诱饵载体。

采用 PEG/LiAc 法将 3 种重组诱饵载体 pBT3N-*TaXI-III*、pBT3STE-*TaXI-III* 和 pBT3SUC-*TaXI-III* 分别与 pOst1-*NubI* 共转化 NMY51 酵母作为功能检测组;与 pPR3-N 共转化作为自激活检测组。以 pTSU2-APP+pNubG-Fe65 为阳性对照,pTSU2-APP+pPR3-N 为阴性对照。经菌液 PCR 鉴定后,将各酵母菌株分别点接于双缺培养基(DDO,SD/-Leu/-Trp)和四缺培养基(QDO/X,含 20 μ g/mL X-gal 的 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp),30 °C 培养 3~5 d,观察菌落生长情况以评估重组诱饵载体的自激活活性及功能。

表 1 构建重组诱饵载体所用的引物序列

Table 1 Primer sequences used for constructing recombinant bait vectors

引物名称	引物序列(5'→3')
pBT3N- <i>TaXI-III</i> -F	ATTCTGTCAGGGCCATTACGGCCATGGCAGGGCTCCTCCTCC
pBT3N- <i>TaXI-III</i> -R	TAGCTACTTACCATGGCTAGCTGCCGCAACCCGTAA
pBT3STE- <i>TaXI-III</i> -F	TTTATGTAATGGCCATTACGGCCGACGGGTCTCCTCCTCGT
pBT3SUC- <i>TaXI-III</i> -F	TATCTGCAATGGCCATTACGGCCCTTCCGGTGCTCGCGCCGGTCA
pBT3STE/SUC- <i>TaXI-III</i> -R	TATCGAATTCCTGCAGGGGTGCGCGCAACCCGTAAAGT

1.5 *TaXI-III* 互作蛋白的筛选与分析

为筛选 *TaXI-III* 互作蛋白,将 pBT3N-*TaXI-III* 转化至 NMY51 酵母并制备为感受态,随后转入小麦 cDNA 文库。转化子涂布于 QDO/X 培养基培养 3~5 d,挑取 55 个直径大于 2 mm 的单克隆,进一步点种于 DDO 与 QDO/X 平板验证。选取复筛阳性

克隆扩大培养,提取酵母质粒并转化至大肠杆菌 DH5 α ,克隆后测序。测序序列在小麦多组学数据库(<http://wheatomics.sdau.edu.cn/>) 进行 BLAST 比对,以确定互作蛋白编号及功能注释。进一步利用 TBtools 软件进行 GO 与 KEGG 富集分析,初步预测候选蛋白可能具有的生物学功能。

1.6 酵母双杂交回转变证

从阳性酵母菌株中提取 pPR3N-候选互作蛋白基因,与 pBT3N-*TaXI-III* 诱饵载体共转化至 NMY51 酵母,涂布于 DDO 平板,30 ℃ 培养 3 d,经菌液 PCR 鉴定,选取阳性克隆扩大培养至 $OD_{546} \approx 1.2$ 。收集菌体,用 0.9% NaCl 溶液重悬至 $OD_{546} = 1.0$,按 10 倍梯度依次稀释为 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 后,分别点样于 DDO 与 QDO/X 平板,30 ℃ 培养 3~5 d,观察菌落生长情况。以 pTSU2-APP+pNubG-*Fe65* 和 pBT3N-*TaXI-III*+pOst1-NubI 为阳性对照,pTSU2-APP+pPR3-N 和 pBT3N-*TaXI-III*+pPR3-N 为阴性对照。

1.7 在本氏烟草中验证 TaXI-III 蛋白与 TaHRLI-2B 蛋白的互作

为验证 TaXI-III 蛋白与 TaHRLI-2B 蛋白的互作关系,分别构建 pCAMBIA1300-*TaXI-III*-nLUC、pCAMBIA1300-*TaHRLI-2B*-eLUC、pUC-*TaXI-III*-SPYNE 和 pUC-*TaHRLI-2B*-SPYCE 重组载体,并转化农杆菌 GV3103。通过农杆菌瞬时侵染本氏烟草叶片,分别进行荧光素酶互补 (LCA) 试验和双分子荧光互补 (BiFC) 试验。LCA 试验中,试验组共表达 *TaXI-III*-nLUC 与 *TaHRLI-2B*-eLUC,对照组设置相应的空载组合,注射 6 周龄烟草叶片后暗培养 24 h,涂抹 D-荧光素钾盐底物,使用活体成像系统检测荧光信号。BiFC 试验中,试验组共表达 *TaXI-III*-SPYNE 与 *TaHRLI-2B*-SPYCE,对照组设置对应的空载组合,注射后暗培养 48 h,通过共聚焦显微镜观察荧光信号。

1.8 实时荧光定量 PCR (qPCR) 分析禾谷镰刀菌侵染条件下 TaHRLI-2B 基因的表达模式

以方法 1.2 中合成的 cDNA 作为 qPCR 模板,以小麦 *TaActin* (AB181991.1) 为内参基因,使用引物 *qTaHRLI-2B-F* (5'-AGGACCAGCAGCAAAGTCTCTC-3')/*qTaHRLI-2B-R* (5'-CGATCCCTTGGCTTGCTTG-3') 和 *qTaActin-F* (5'-GTGAGCCACACTGTTCCAATC-TATG-3')/*qTaActin-R* (5'-CCACCGATCCAGACACTGTATTTC-3') 进行荧光定量 PCR 扩增,反应体系与程序参考 SYBR Green 试剂盒说明书,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 *TaHRLI-2B* 基因在小麦接种禾谷镰刀菌后不同时间的相对表达量。

1.9 过表达 TaHRLI-2B 基因拟南芥的筛选及其抗病性鉴定

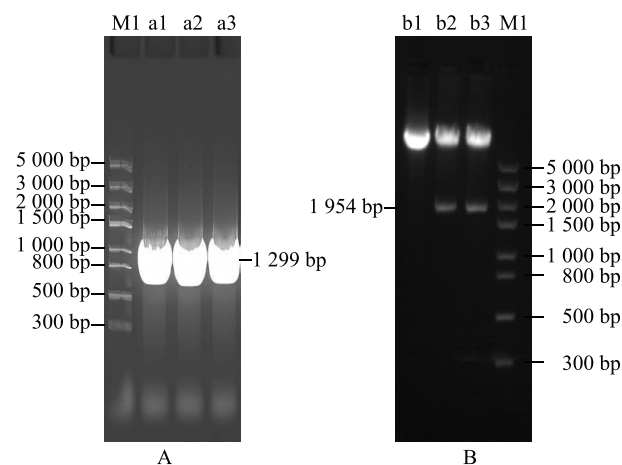
通过同源重组将 *TaHRLI-2B* 基因的编码序列 (CDS) 克隆至 pHZM33-*GUS* 载体,构建 pHZM33-*TaHR-*

LI-2B 植物表达载体。采用农杆菌 GV3101 介导的花序浸染法获得转基因拟南芥^[17],通过 0.1% Basta 抗性筛选及反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 验证获得阳性植株,并将阳性植株自交繁殖至 T3 代纯合系。取 T3 代拟南芥离体莲座叶片,经创伤处理后,接种 5 μ L 含量为 1 mL 5×10^5 个孢子的禾谷镰刀菌孢子悬浮液,将叶柄嵌入含 0.7% 琼脂的培养皿,于温度 22 ℃、相对湿度 100%、16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养 5~7 d,观察发病情况。每株设 3 次生物学重复,评估 *TaHRLI-2B* 基因过表达对病原菌抗性的影响。

2 结果与分析

2.1 小麦 TaXI-III 基因的克隆及其亚细胞定位植物表达载体构建

本研究以安农 1589 小麦 cDNA 为模板,采用特异性引物 *TaXI-III-F*/*TaXI-III-R* 进行 PCR 扩增,获得 *TaXI-III* 基因编码区。产物经纯化后克隆至 pBlunt 载体,转化大肠杆菌 DH5 α 并进行克隆、测序,成功获得长度为 1 299 bp 的 *TaXI-III* 基因序列 (图 1A)。以此为基础,通过同源重组法构建 pHZM27-*TaXI-III*-EGFP 植物表达载体。经菌液 PCR 初筛和 *Xho* I/*Spe* I 双酶切验证,酶切后产生 1 954 bp 的片段 (图 1B)。重组质粒测序结果表明,插入序列与 *TaXI-III* 基因完全一致,证实表达载体构建正确。



M1: Trans5K DNA marker; a1~a3: PCR 扩增含有 pBlunt-*TaXI-III* 的阳性菌液; b1: 未酶切的 pHZM27-*TaXI-III*-EGFP 质粒; b2、b3: *Xho* I/*Spe* I 双酶切的 pHZM27-*TaXI-III*-EGFP 质粒。

图1 *TaXI-III* 基因的克隆与亚细胞定位植物表达载体 pHZM27-*TaXI-III*-EGFP 的构建

Fig.1 Cloning of the *TaXI-III* gene and construction of the plant expression vector pHZM27-*TaXI-III*-EGFP for subcellular localization

2.2 TaXI-III 蛋白亚细胞定位分析

Cell-PLoc 2.0 预测 TaXI-III 蛋白定位于细胞膜, CELLO v.2.5 与 DeepLoc-2.0 预测其定位于质膜和(或)细胞外。为验证上述预测,通过农杆菌介导的瞬时转化在烟草叶片中表达 pHZM27-TaXI-III-EGFP 及 pHZM27-EGFP。激光共聚焦显微镜观察结果显示, TaXI-III::EGFP 融合蛋白的绿色荧光信

号特异性分布于细胞质膜/细胞周边区域,在细胞质与细胞核中均未检测到明显荧光信号,而对照空载体 EGFP 的荧光信号则广泛分布于细胞周边、细胞质及细胞核中(图 2)。表明 TaXI-III 蛋白主要定位于细胞膜/细胞壁区域,与预测结果一致。因此,在后续筛选 TaXI-III 互作蛋白时,需采用分裂泛素系统膜体系酵母双杂交技术。

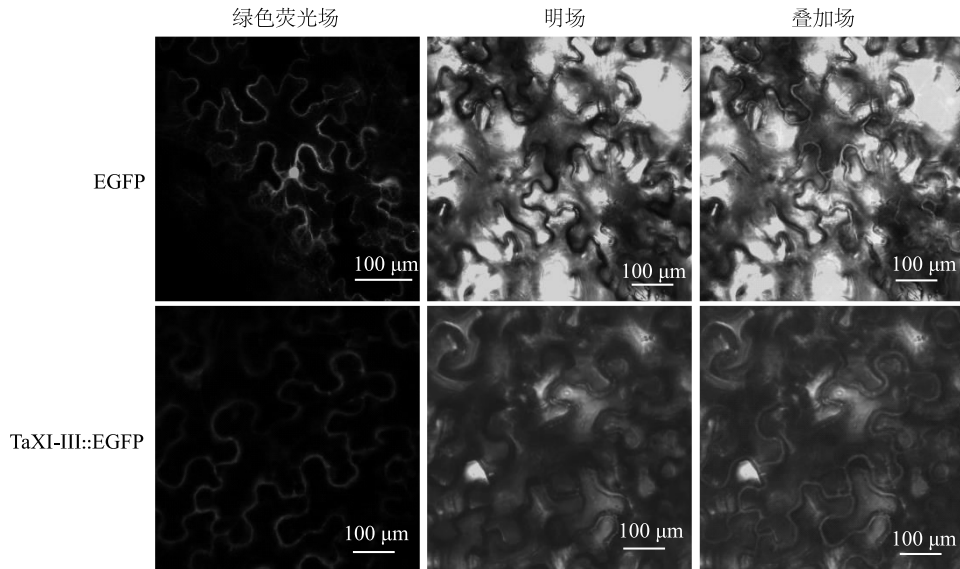


图 2 TaXI-III 蛋白在烟草叶片上亚细胞定位结果

Fig.2 Subcellular localization of TaXI-III proteins in tobacco leaves

2.3 诱饵载体的构建及功能与自激活检测

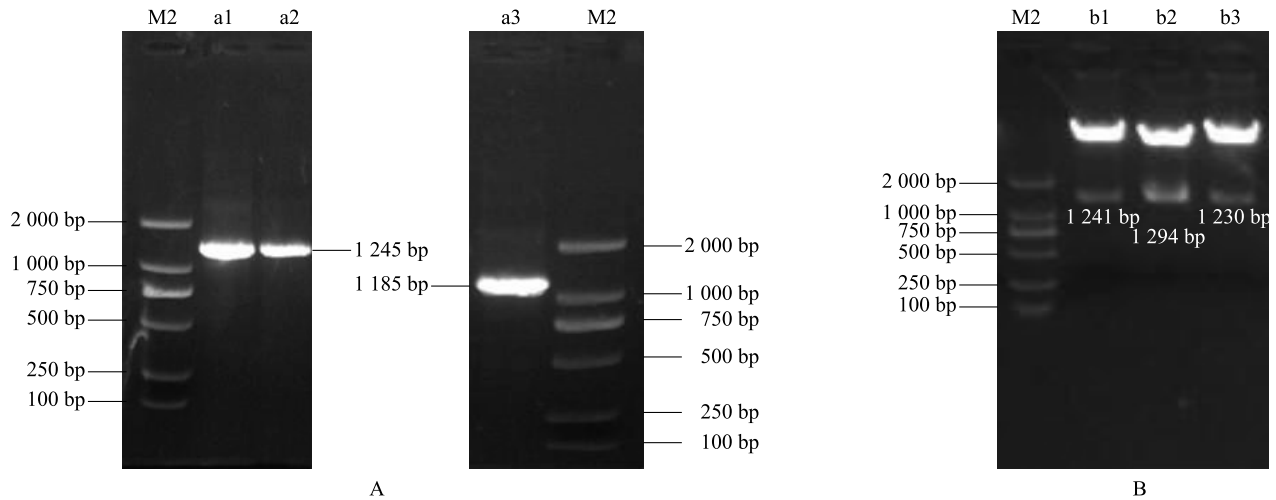
为构建酵母双杂交诱饵载体,以 pBlunt-TaXI-III 为模板,利用表 1 中的同源重组引物,通过 PCR 扩增获得大小约 1 245 bp、1 245 bp 和 1 185 bp 的目的片段(图 3A)。纯化后的片段分别与经双酶切线性化的 pBT3-N、pBT3-STE 及 pBT3-SUC 载体进行同源重组连接,转化大肠杆菌 DH5 α 后筛选阳性克隆并提取重组质粒。经限制性内切酶酶切验证, pBT3N-TaXI-III (Pst I/Sac II 酶切)、pBT3STE-TaXI-III (Xba I/Hind III 酶切) 和 pBT3SUC-TaXI-III (Xba I/Pst I 酶切) 分别产生 1 241 bp、1 294 bp 和 1 230 bp 的预期片段(图 3B)。酶切检测正确的重组质粒经测序证实各重组载体中插入序列与 TaXI-III 完全一致,表明重组诱饵载体构建成功。

为筛选合适的诱饵载体,本研究对 3 种重组载体进行功能与自激活验证(图 4)。从图 4 可见,所有酵母转化子在 DDO 平板上均正常生长,表明转化成功。功能分析结果显示, pBT3N-TaXI-III、

pBT3STE-TaXI-III 与 pBT3SUC-TaXI-III 分别与 pOst1-NubI 共转化菌株在 QDO/X 平板上均能生长并显蓝色,表明三者均可表达活性蛋白。自激活检测中,仅 pBT3N-TaXI-III 与 pPR3N 共转化株在 QDO/X 上不生长,表明其无自激活活性。因此,选取 pBT3N-TaXI-III 用于后续互作蛋白筛选。

2.4 酵母双杂交筛选 TaXI-III 的互作蛋白及候选互作蛋白的功能分析

为进一步验证互作真实性,将 55 个候选克隆点种于 DDO 与 QDO/X 平板进行复筛,结果(图 5)显示,多数克隆在 QDO/X 平板上生长良好且显蓝色,表明其编码蛋白可能与 TaXI-III 蛋白互作。从中选取生长良好且显色清晰的菌落提取质粒,转化大肠杆菌 DH5 α 进行克隆并测序。经小麦多组学数据库比对及去重后,最终获得 19 个 TaXI-III 潜在互作蛋白(表 2)。GO 功能富集结果表明,这些蛋白质可能参与信号转导、跨膜运输、程序性细胞死亡及生物/非生物胁迫响应等过程(图 6)。



M2:Trans2K DNA marker;图 A 中 a1~a3 分别为插入到 pBT3-N、pBT3-STE、pBT3-SUC 载体中的 *TaXI-III* 基因 PCR 片段;图 B 中 b1~b3 分别为双酶切后的 pBT3N-*TaXI-III*、pBT3STE-*TaXI-III*、pBT3SUC-*TaXI-III* 重组诱饵质粒。

图 3 *TaXI-III* 的 PCR 扩增与重组诱饵载体双酶切检测结果

Fig.3 PCR amplification products of *TaXI-III* and double enzyme digestion of recombinant bait vectors

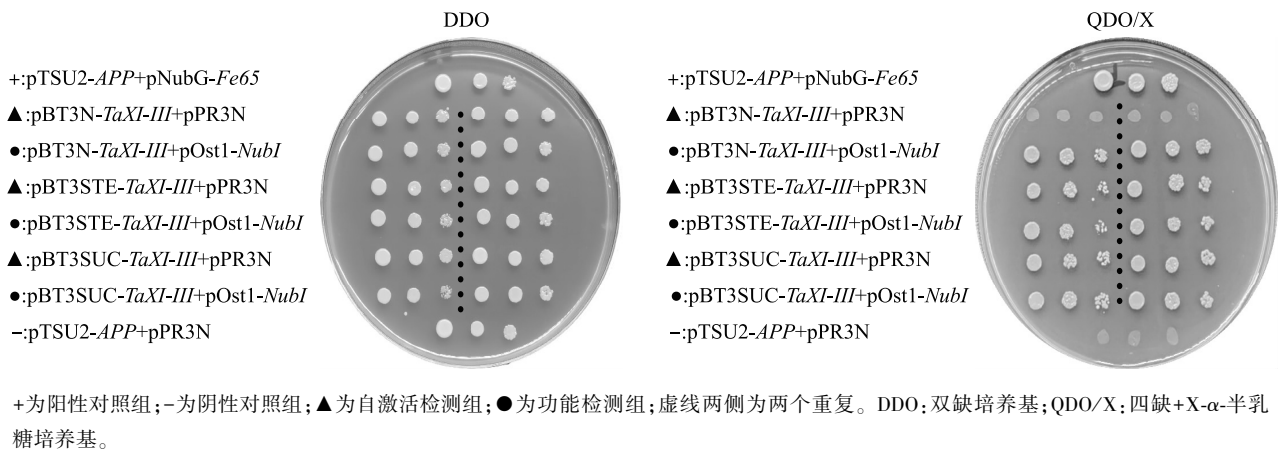


图 4 重组诱饵载体的功能检测与自激活检测结果

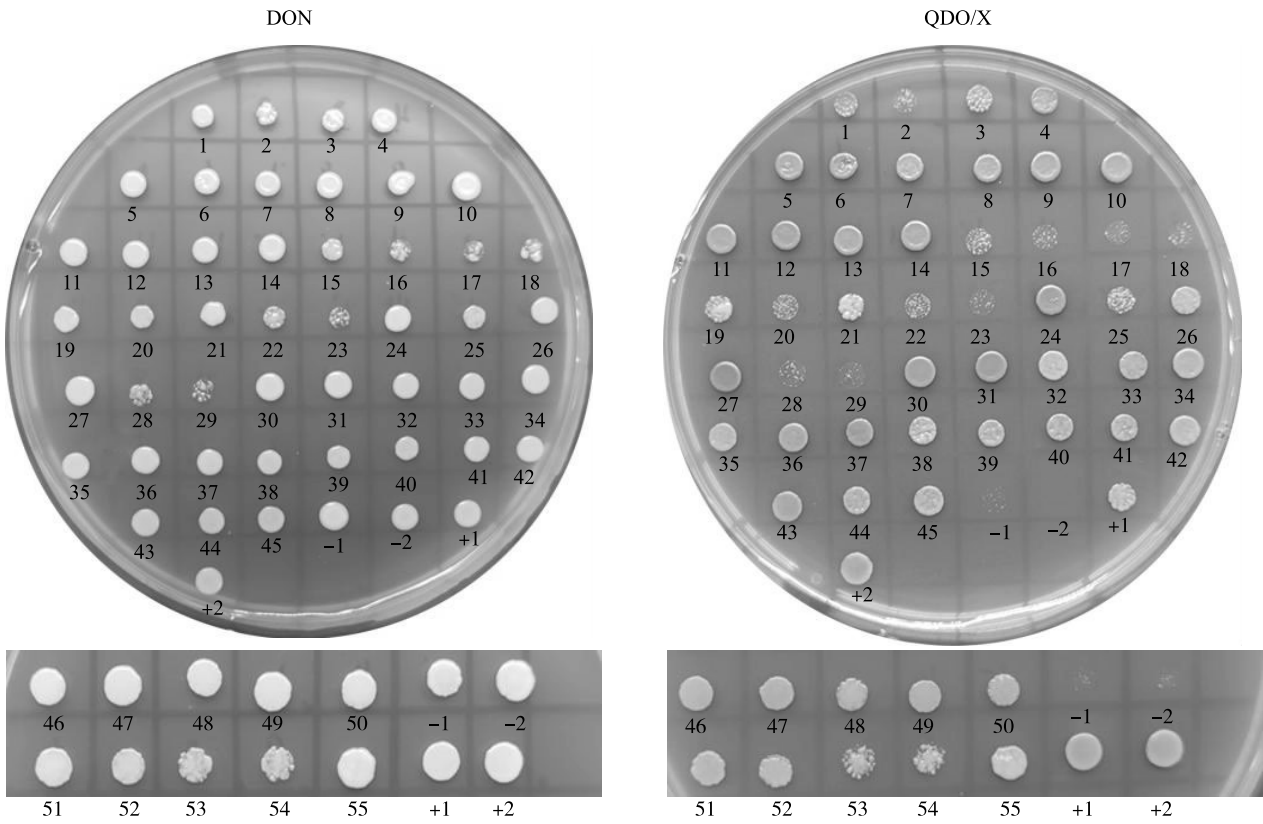
Fig.4 Functional detection and autoactivation detection of recombinant bait vectors

2.5 *TaXI-III* 与部分候选互作蛋白的回转验证

为验证 *TaXI-III* 与候选互作蛋白的互作关系,将筛选获得的猎物载体(包括 pPR3N-*TaBI-1-6D*、pPR3N-*TaRBL-2B*、pPR3N-*TaTrx-5A*、pPR3N-*TaHRLI-4B*、pPR3N-*TaHRLI-2B*、pPR3N-*TaHRLI-4A*)分别与诱饵载体 pBT3N-*TaXI-III* 共转化至 NMY51 酵母细胞中,鉴定、稀释后点样于 DDO 和 QDO/X 平板上,结果(图 7)显示,所有共转化菌株在 DDO 平板上均正常生长,表明转化成功。在 QDO/X 平板上,阴性对照组未见生长,而阳性对照组及所有试验组均正常生长且呈现蓝色,表明 *TaXI-III* 蛋白与上述候选互作蛋白质在酵母细胞内均存在特异性相互作用。

2.6 *TaXI-III* 蛋白与 *TaHRLI-2B* 蛋白互作验证

为确认 *TaXI-III* 蛋白与 *TaHRLI-2B* 蛋白在植物体内是否存在互作关系,利用农杆菌介导的瞬时转化在烟草叶片分别进行荧光素酶互补(LCA)试验和双分子荧光互补(BiFC)试验。LCA 试验结果(图 8A)显示,共注射 *TaXI-III*-nLUC 与 *TaHRLI-2B*-cLUC 的烟草叶片区域可检测到强烈的荧光信号,而 3 组阴性对照(nLUC+cLUC、nLUC+*TaHRLI-2B*-cLUC、*TaXI-III*-nLUC+cLUC)均无荧光信号,表明两者在植物体内存在特异性互作。BiFC 试验进一步验证了这一结果:共转 pUC-*TaXI-III*-SPYNE 和 pUC-*TaHRLI-2B*-SPYCE 的叶片细胞周边在激光共聚焦显微镜下可见明显黄色荧光信号,而各阴性对照均无荧光产生(图 8B)。



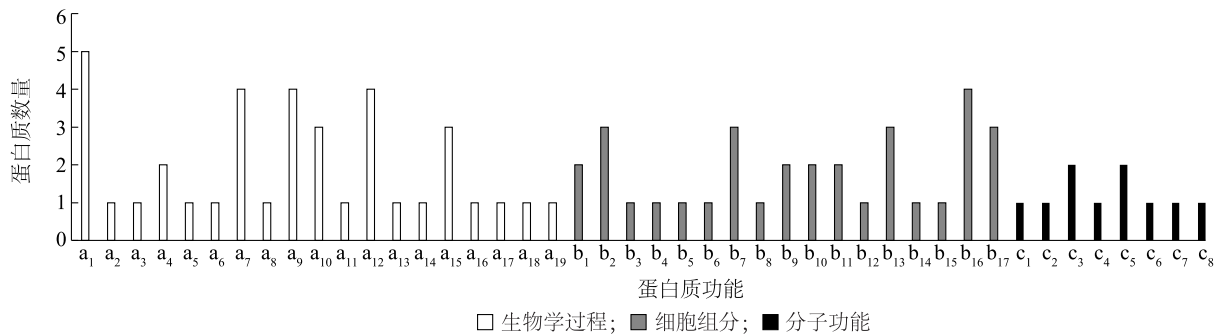
-1: 阴性对照 pTSU2-APP+pPR3N; -2: 阴性对照 pBT3N-TaXI-III+pPR3N; +1: 阳性对照 pTSU2-APP+pNubG-Fe65; +2: 阳性对照 pBT3N-TaXI-III+pOst1-NubI。DDO、QDO/X 见图 4 注。1~55: 候选克隆。

图 5 木聚糖酶 TaXI-III 互作蛋白的筛选结果
Fig.5 Screening of proteins interacting with xylanase TaXI-III

表 2 小麦 TaXI-III 潜在互作蛋白的基因 ID 及功能注释

Table 2 Gene identifiers and functional annotations of potential interacting proteins with TaXI-III in wheat

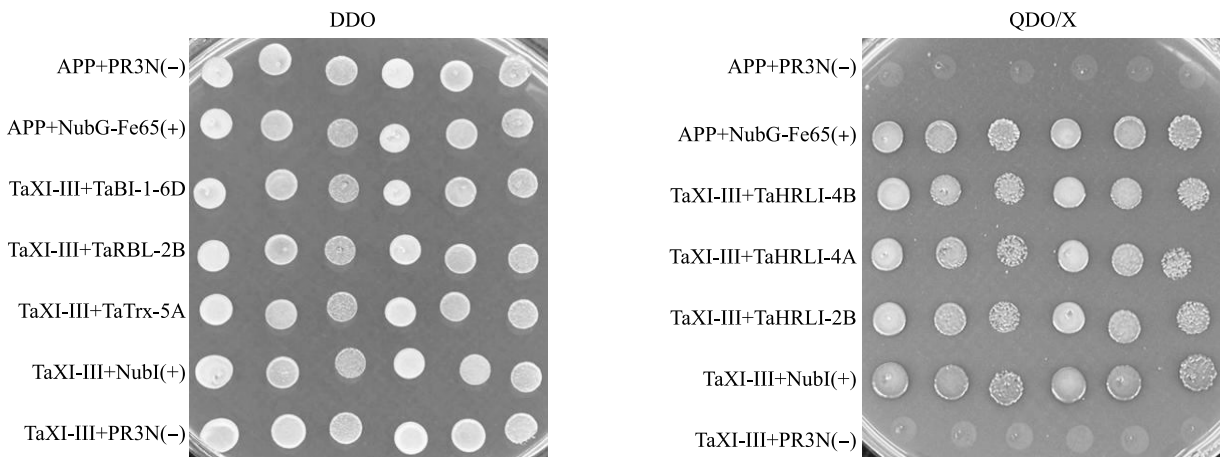
克隆编号	基因 ID	功能注释
3	<i>TraesCS6D02G077000.1</i>	Bax 抑制剂 1 样蛋白
4	<i>TraesCS4B02G026400.1</i>	RNA 结合蛋白
5、7	<i>TraesCS5A02G482800.1</i>	光系统 I 反应中心亚基 IV
6、8	<i>TraesCS2B02G118800.1</i>	蓖麻毒素 b 样凝集素 R40G2
9、10、11、12、13、30	<i>TraesCS3B02G376600.1</i>	30S 核糖体蛋白 S5
14、41/44、45	<i>TraesCS3D02G332400.1/TraesCS3A02G338800.1</i>	核糖体蛋白 L34e 超家族蛋白
24、27	<i>TraesCS3D02G260300.1</i>	几丁质酶
26、34	<i>TraesCS5B02G033100.1</i>	转体基因蛋白
31	<i>TraesCS5A02G205000.2</i>	硫氧还原蛋白
32	<i>TraesCS3B02G473000.1</i>	YGL010w 样蛋白
33	<i>TraesCS2A02G188600.1</i>	多元醇运输因子
35、47/39/46、50	<i>TraesCS4B02G316300.1/TraesCS2B02G040200.1/TraesCS4A02G415500.1</i>	HR 样病变诱导蛋白相关蛋白
36	<i>TraesCS3A02G303300.1</i>	脂多糖出口系统渗透酶蛋白 LptF
37	<i>TraesCS6B02G330700.1</i>	脂肪加氧酶结合结构域 1
38	<i>TraesCS5B02G270000.1</i>	质子泵交换器 1
42、43、51	<i>TraesCS6D02G100900LC.1</i>	DNA 定向 RNA 聚合酶亚基



a₁: 细胞过程; a₂: 对生物刺激的响应; a₃: 翻译; a₄: 蛋白质代谢过程; a₅: 细胞程序性死亡; a₆: 解剖结构发育; a₇: 代谢过程; a₈: 跨膜运输; a₉: 对非生物刺激的响应; a₁₀: 生物合成过程; a₁₁: 脂质代谢过程; a₁₂: 对胁迫的响应; a₁₃: 多细胞生物体发育; a₁₄: 细胞组分组织化; a₁₅: 对化学物质的响应; a₁₆: 细胞通讯; a₁₇: 含氮碱基化合物代谢过程; a₁₈: 信号转导; a₁₉: 胚后发育; b₁: 质体; b₂: 细胞核; b₃: 核被膜; b₄: 胞质溶胶; b₅: 液泡; b₆: 核糖体; b₇: 膜; b₈: 核质; b₉: 内质网; b₁₀: 核仁; b₁₁: 叶绿体; b₁₂: 外部包被结构; b₁₃: 细胞质; b₁₄: 类囊体; b₁₅: 细胞壁; b₁₆: 细胞内解剖结构; b₁₇: 质膜; c₁: 催化活性; c₂: 染色质结合; c₃: RNA 结合; c₄: 蛋白质结合; c₅: 核酸结合; c₆: DNA 结合; c₇: 结构分子活性; c₈: 转运蛋白活性。

图 6 TaXI-III 互作蛋白的 GO 富集分析结果

Fig.6 GO enrichment analysis of proteins interacting with TaXI-III



-: 阴性对照 APP+PR3N、TaXI-III+PR3N; +: 阳性对照 APP+NubG-Fe65、TaXI-III+Nubi。DDO、QDO/X 见图 4 注。

图 7 TaXI-III 蛋白与候选互作蛋白回转验证结果

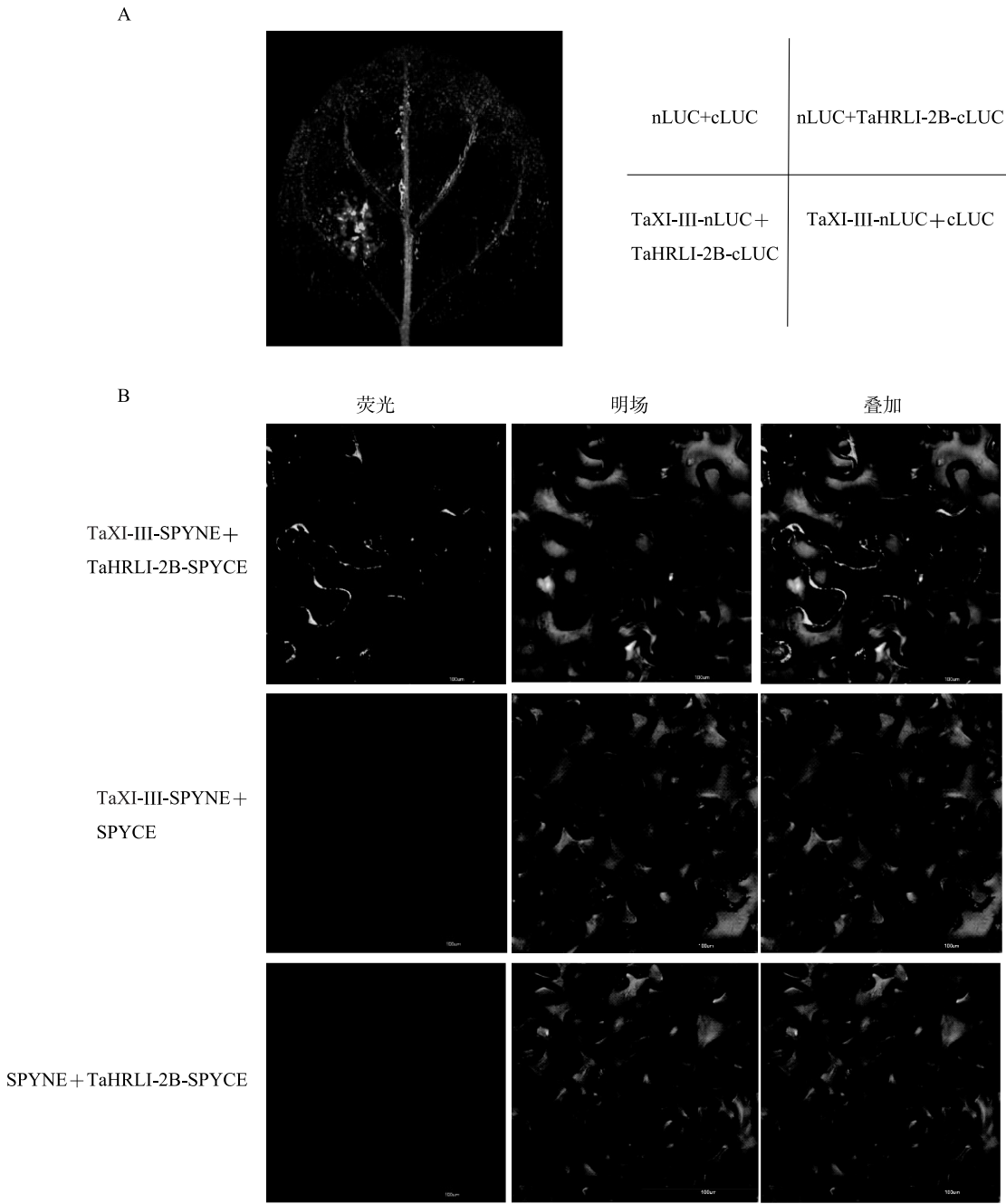
Fig.7 Rotation validation of TaXI-III and candidate interacting proteins

2.7 小麦穗接种禾谷镰刀菌后 *TaHRLI-2B* 基因的表达模式

小麦扬花期对每朵小花接种禾谷镰刀菌, 采用 RT-qPCR 分析接种病原菌后不同时间 *TaHRLI-2B* 基因的表达变化, 结果如图 9 所示, 随着时间的延长, *TaHRLI-2B* 基因的相对表达量呈现先升高再降低的趋势, 但从 12 h 后相对表达量均高于对照 (0 h), 在接种 72 h 时相对表达量达到峰值。表明禾谷镰刀菌侵染小麦后会诱导 *TaHRLI-2B* 基因上调表达, 据此推测, *TaHRLI-2B* 基因可能参与小麦赤霉病抗性反应。

2.8 转 *TaHRLI-2B* 基因拟南芥的鉴定与抗禾谷镰刀菌的侵染

为验证 *TaHRLI-2B* 基因的抗病能力, 本研究构建了 pHZM33-*TaHRLI-2B* 表达载体, 通过农杆菌 GV3101 介导的花序浸染法转化拟南芥。经 Basta 抗性筛选, 转基因株系 (OE1~OE3) 叶片生长正常, 而野生型植株 (WT) 则明显枯黄死亡 (图 10A)。进一步提取拟南芥的 RNA 进行 RT-PCR 分析, 结果 (图 10B) 显示, 所有株系均表达内参基因 *AtActin2*, 而 *TaHRLI-2B* 仅在转基因株系中表达, 表明 *TaHRLI-2B* 基因已成功整合并表达。采用离体叶片接种



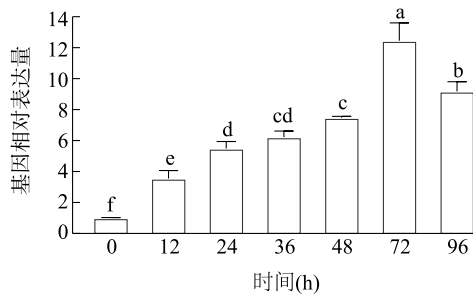
A: 荧光素酶互补 (LCA) 试验; B: 双分子荧光互补 (BiFC) 试验。图 A 中荧光区域 (左下象限组合) 为试验组 (TaXI-III-nLUC+TaHRLI-2B-cLUC), 该区域存在强烈荧光信号, 代表 TaXI-III 蛋白与 TaHRLI-2B 蛋白在植物体内发生特异性互作, 无荧光的 3 个区域为阴性对照, 即左上象限的 nLUC + cLUC (空载对照), 右上象限的 nLUC + TaHRLI-2B-cLUC (仅含 TaHRLI-2B 的单侧对照), 右下象限的 TaXI-III-nLUC + cLUC (仅含 TaXI-III 的单侧对照); 图 B 中第一行为 TaXI-III+TaHRLI-2B 的互作正对照, 第二、第三行分别为 TaXI-III+空载体、空载体+TaHRLI-2B 的阴性对照。

图 8 TaXI-III 蛋白与 TaHRLI-2B 蛋白的荧光素酶互补试验和双分子荧光互补试验结果

Fig.8 The detected interaction between TaXI-III protein and TaHRLI-2B protein of wheat by luciferase complementation assay and bimolecular fluorescence complementation assay

法, 分别对 WT 和 OE1~OE3 株系接种禾谷镰刀菌, 培养 5 d 后, WT 接种区域出现显著黄化、褐变及菌丝扩展。相比之下, 转基因株系叶片病斑明显减轻 (图 10C)。综上, 过表达 *TaHRLI-2B* 基因能够提高

拟南芥对禾谷镰刀菌的抗性。



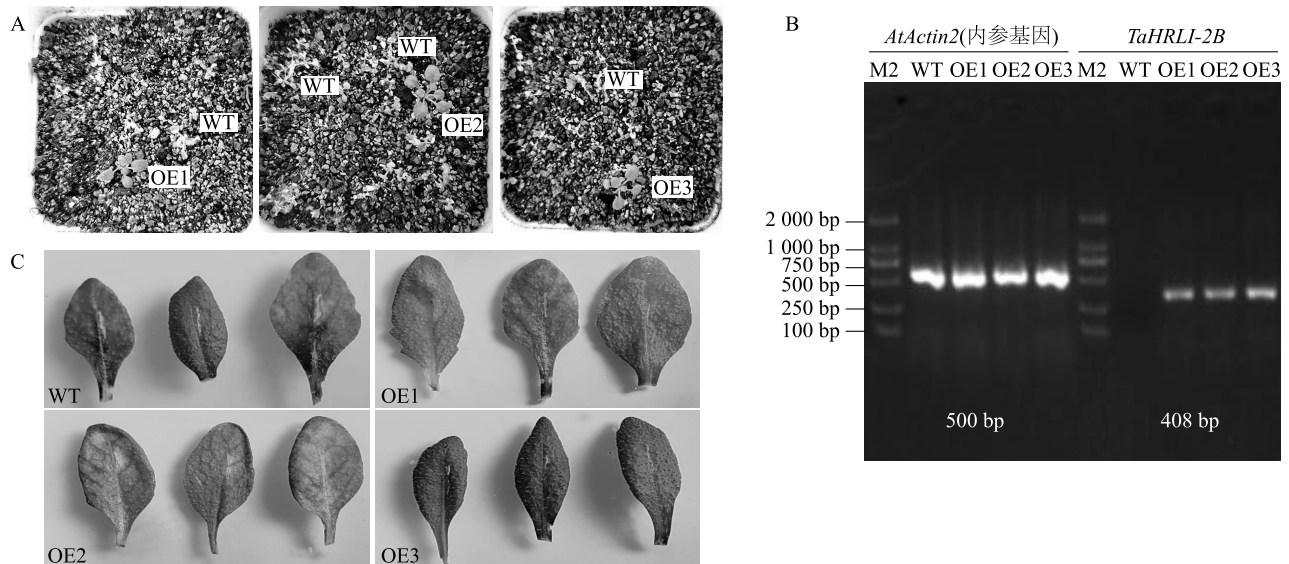
图柱上不同小写字母表示不同处理时间间差异达显著水平 ($P < 0.05$)。

图9 禾谷镰刀菌侵染条件下 *TaHRLI-2B* 基因的表达

Fig.9 Expression of *TaHRLI-2B* gene under *Fusarium graminearum* infection conditions

3 讨论

小麦木聚糖酶抑制剂 TaXI-III 受禾谷镰刀菌诱导表达,在抵御赤霉病中起重要作用。TaXI-III 既可抑制病原菌木聚糖酶对细胞壁的降解,又能抑制其诱导细胞坏死,具备双重抗病功能^[13-16]。已有研究表明,TaXI 通过关键残基插入木聚糖酶催化中心,阻断其活性位点,并借助疏水作用与空间位阻模拟底物,从而抑制酶活^[18]。然而,TaXI 抑制木聚糖酶诱发细胞坏死的机制及其在小麦抗病过程中的互作网络仍不清楚。鉴于 TaXI-III 定位于细胞膜和(或)细胞壁,本研究采用分裂泛素酵母双杂交系统^[19-21]进行互作筛选,这项技术广泛应用于膜蛋白、膜相关蛋白及可溶性蛋白的互作研究^[22]。



A: 喷施 Basta 筛选转基因拟南芥; B: *TaHRLI-2B* 基因过表达拟南芥的 RT-PCR 鉴定; C: *TaHRLI-2B* 基因过表达拟南芥对禾谷镰刀菌的抗性鉴定。WT: 野生型拟南芥; OE1~OE3: *TaHRLI-2B* 基因过表达拟南芥; M2: Trans2K DNA marker。

图10 *TaHRLI-2B* 基因过表达拟南芥的鉴定及其对禾谷镰刀菌的抗性评估

Fig.10 Identification of *TaHRLI-2B* overexpressing *Arabidopsis thaliana* lines and resistance to *Fusarium graminearum*

以 pBT3N-TaXI-III 为诱饵载体,通过筛选禾谷镰刀菌侵染的小麦穗部 cDNA 文库共获得 19 个 TaXI-III 候选互作蛋白,其功能涉及信号转导、跨膜运输、细胞程序性死亡及生物/非生物胁迫响应等过程。为排除假阳性,酵母回转试验验证了 TaXI-III 与 TaBI-1-6D (BAX 抑制因子-1)、TaRBL-2B (蓖麻毒素 B 样凝集素)、TaTrx-5A (硫氧还蛋白) 以及 3 个 HR 样病变诱导蛋白 (TaHRLI-4B、TaHRLI-2B 和 TaHRLI-4A) 存在

互作关系。其中,TaXI-III 蛋白与 TaHRLI-2B 蛋白的互作关系通过 LAC 试验与 BiFC 试验在烟草体内得到进一步确认。已有研究表明,上述候选互作蛋白在植物免疫中具有重要功能。过表达拟南芥 *BI-1* 基因能够增强水稻细胞在稻瘟病菌激发子处理下的存活能力^[23];小麦 TaBI-1.1 可与水通道蛋白 TaPIP1 互作共同调控防御反应,在拟南芥中过表达 *TaBI-1.1* 基因能够提高其对丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syrin-*

gae pv. *tomato* DC3000) 的抗性^[24]。小麦 TaRBL 可与赤霉病抗性相关蛋白 TaPFT 互作,其基因沉默会显著降低小麦对赤霉病的抗性^[25]。水稻 OsTrxm 蛋白通过与 OsMESL 蛋白互作调控活性氧积累,影响对白叶枯病的抗性^[26];小麦 TaTrxh1 蛋白与 TaCP1 蛋白互作,通过水杨酸(SA)信号通路增强对条锈病的抗性^[27]。HRLI 是一类参与植物超敏反应(HR)的抗病相关蛋白质,水稻 *OsHRLI* 基因受黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)诱导表达,其过表达可提高植株的抗病性^[28];本氏烟草中过表达 *NbHRLI4* 基因也能增强植株对芜菁花叶病毒(TuMV)的抗性,反之其沉默则促进 TuMV 积累^[29]。本研究共鉴定出 3 个与 TaXI-III 互作的 TaHRLI 蛋白,其中 *TaHRLI-2B* 基因受禾谷镰刀菌诱导表达,在拟南芥中过表达 *TaHRLI-2* 基因可延缓病原扩展并增强抗病性。

禾谷镰刀菌侵染小麦过程中分泌的木聚糖酶 *FGSG_03624* 与 *FGSG_10999* 可激发寄主 HR 反应,引发活性氧积累与细胞坏死^[8,30],而 *TaXI-III* 基因的过表达能有效抑制上述病理过程,从而减轻赤霉病症状^[14,16]。本研究筛选的候选互作蛋白可能通过与 TaXI-III 互作共同参与调控活性氧代谢、细胞死亡及防御反应,从而增强小麦对禾谷镰刀菌的抗性,然而其具体分子机制仍有待深入解析。

4 结 论

小麦木聚糖酶抑制剂 TaXI-III 定位于细胞膜和(或)细胞壁。以 pBT3N-*TaXI-III* 为诱饵,采用分裂泛素酵母双杂交技术从小麦 cDNA 文库中筛选出 19 个 TaXI-III 候选互作蛋白,功能涉及信号转导、跨膜运输、细胞程序性死亡及胁迫响应等过程。通过酵母回转、LAC 及 BiFC 试验验证了 TaXI-III 与超敏反应相关蛋白 TaHRLI-2B 的互作关系。*TaHRLI-2B* 基因受禾谷镰刀菌诱导表达,其在拟南芥中过表达可增强其对病原菌的抗性。本研究结果为解析 *TaXI-III* 基因调控小麦抗赤霉病的分子机制及抗病基因挖掘提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 周晴晴,路艳琴,陆景倩,等. 小麦赤霉病生防机制研究进展[J]. 江苏农业科学,2023,51(3):1-8.
- [2] Schweiger W, Steiner B, Vautrin S, et al. Suppressed recombination and unique candidate genes in the divergent haplotype encoding *Fhb1*, a major *Fusarium* head blight resistance locus in wheat

- [J]. Theoretical and Applied Genetics,2016,129(8):1607-1623.
- [3] 翟文玲,刘彩云,刘颖,等. 小麦赤霉病新抗源的发掘与抗性位点的检测分析[J]. 生物技术进展,2021,11(5):581-589.
- [4] 张曼,张叶卓,何其邹洪,等. 植物细胞壁结构及成像技术研究进展[J]. 生物技术通报,2023,39(7):113-122.
- [5] Guzha A, McGee R, Scholz P, et al. Cell wall-localized BETA-XYLOSIDASE4 contributes to immunity of *Arabidopsis* against *Botrytis cinerea*[J]. Plant Physiology,2022,189(3):1794-1813.
- [6] 康振生,黄丽丽,韩青梅,等. 禾谷镰刀菌侵染引致小麦穗组织细胞壁成分变化的细胞化学研究[J]. 植物病理学报,2007,37(6):623-628.
- [7] Beliën T, Van Campenhout S, Van Acker M, et al. Cloning and characterization of two endoxylanases from the cereal phytopathogen *Fusarium graminearum* and their inhibition profile against endoxylanase inhibitors from wheat[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2005,327(2):407-414.
- [8] Sella L, Gazzetti K, Faoro F, et al. A *Fusarium graminearum* xylanase expressed during wheat infection is a necrotizing factor but is not essential for virulence[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2013,64:1-10.
- [9] Dornez E, Croes E, Gebruers K, et al. Accumulated evidence substantiates a role for three classes of wheat xylanase inhibitors in plant defense[J]. Critical Reviews in Plant Sciences,2010,29(4):244-264.
- [10] Debyser W, Derdelinckx G, Delcour J A. Arabinoxylan solubilization and inhibition of the barley malt xylanolytic system by wheat during mashing with wheat wholemeal adjunct:evidence for a new class of enzyme inhibitors in wheat[J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists,1997,55(4):153-156.
- [11] Igawa T, Ochiai-Fukuda T, Takahashi-Ando N, et al. New TAXI-type xylanase inhibitor genes are inducible by pathogens and wounding in hexaploid wheat[J]. Plant & Cell Physiology,2004,45(10):1347-1360.
- [12] Dornez E, Croes E, Gebruers K, et al. 2-D DIGE reveals changes in wheat xylanase inhibitor protein families due to *Fusarium graminearum* Δ Tri5 infection and grain development[J]. Proteomics, 2010,10(12):2303-2319.
- [13] Liu Y, Han N N, Wang S, et al. Genome-wide identification of *Triticum aestivum* xylanase inhibitor gene family and inhibitory effects of XI-2 subfamily proteins on *Fusarium graminearum* GH11 xylanase[J]. Frontiers in Plant Science,2021,12:665501.
- [14] Moscetti I, Tundo S, Janni M, et al. Constitutive expression of the xylanase inhibitor TAXI-III delays *Fusarium* head blight symptoms in durum wheat transgenic plants[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions,2013,26(12):1464-1472.
- [15] Tundo S, Moscetti I, Faoro F, et al. *Fusarium graminearum* produces different xylanases causing host cell death that is prevented by the xylanase inhibitors XIP-I and TAXI-III in wheat[J]. Plant Science,2015,240:161-169.
- [16] Moscetti I, Faoro F, Moro S, et al. The xylanase inhibitor TAXI-

- III counteracts the necrotic activity of a *Fusarium graminearum* xylanase *in vitro* and in durum wheat transgenic plants[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2015, 16(6):583-592.
- [17] 高 营,林 云,袁星星,等. 蚕豆 *VfGAS1* 基因的异源过表达延迟拟南芥开花[J]. *江苏农业学报*, 2021, 37(1):44-52.
- [18] Raedschelders G, Fierens K, Sansen S, et al. Molecular identification of wheat endoxylanase inhibitor TAXI-II and the determinants of its inhibition specificity[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 335(2):512-522.
- [19] 王沙沙,何 宁,汪庆昌,等. 小麦 γ -醇溶蛋白基因 *Tagli- γ -11* 的克隆及其互作蛋白质分析[J]. *江苏农业学报*, 2025, 41(5):833-839.
- [20] 马 燕,韩玉龙,吴兴兴,等. 灰霉菌胁迫下番茄叶片 cDNA 文库构建及 SlbZIP1 互作蛋白筛选鉴定[J]. *江苏农业科学*, 2024, 52(18):35-41.
- [21] 张胜花,费正林,杨胡艳,等. 冠突曲霉 UBC 与 MAT1-2-1 互作关系验证及功能研究[J]. *南方农业学报*, 2024, 55(6):1573-1582.
- [22] 黄欣媛,范红波. 酵母双杂交及其衍生系统[J]. *生物技术通报*, 2014, 30(1):75-82.
- [23] Matsumura H, Nirasawa S, Kiba A, et al. Overexpression of Bax inhibitor suppresses the fungal elicitor-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) cells[J]. *The Plant Journal*, 2003, 33(3):425-434.
- [24] Lu P P, Yu T F, Zheng W J, et al. The wheat Bax inhibitor-1 protein interacts with an aquaporin TaPIP1 and enhances disease resistance in *Arabidopsis* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9:20.
- [25] Song P W, Zhang L F, Wu L L, et al. A ricin B-like lectin protein physically interacts with TaPFT and is involved in resistance to *Fusarium* head blight in wheat [J]. *Phytopathology*, 2021, 111(12):2309-2316.
- [26] Hu B, Zhou Y, Zhou Z H, et al. Repressed *OsMESL* expression triggers reactive oxygen species-mediated broad-spectrum disease resistance in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(8):1511-1522.
- [27] Shi B B, Zhao X B, Li M, et al. Wheat thioredoxin (TaTrxh1) associates with RD19-like cysteine protease *TaCPI* to defend against stripe rust fungus through modulation of programmed cell death[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2021, 34(4):426-438.
- [28] Park S R, Moon S J, Shin D J, et al. Isolation and characterization of rice *OsHRL* gene related to bacterial blight resistance[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2010, 26(4):417-420.
- [29] Wu X Y, Lai Y C, Rao S F, et al. Genome-wide identification reveals that *Nicotiana benthamiana* hypersensitive response (HR)-like lesion inducing protein 4 (NbHRLI4) mediates cell death and salicylic acid-dependent defense responses to turnip mosaic virus [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12:627315.
- [30] Tundo S, Paccanaro M C, Bigini V, et al. The *Fusarium graminearum* *FGSG_03624* xylanase enhances plant immunity and increases resistance against bacterial and fungal pathogens[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(19):10811.

(责任编辑:黄克玲)