

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2013.01720

## 抗小麦黄矮病相关蛋白激酶 TiDPK1 与 BYDV 外壳蛋白的互作

汪信东 陈 亮 张增艳\*

中国农业科学院作物科学研究所 / 农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程 / 农业部麦类生物学与遗传育种重点实验室, 北京 100081

**摘 要:** 小麦黄矮病是由大麦黄矮病毒(*Barley yellow dwarf virus*, BYDV)引起的小麦重要病毒病。分离于小麦-中间偃麦草易位系的蛋白激酶编码基因 *TiDPK1*, 是一个抗小麦黄矮病相关基因。本文报道利用酵母双杂交技术和双分子荧光互补技术对 *TiDPK1* 与 BYDV 外壳蛋白(coat protein, CP)互作的研究结果。酵母双杂交分析结果表明, *TiDPK1* 能够与 BYDV-GAV、-PAV 株系的 CP 互作, 双分子荧光互补分析结果进一步表明, *TiDPK1* 可与 BYDV 的 CP 互作、产生双分子荧光互补信号, 说明 *TiDPK1* 确可与 BYDV CP 相互作用, 该结果对了解 *TiDPK1* 在小麦抗 BYDV 反应机制具有一定意义。

**关键词:** 小麦; 蛋白激酶 *TiDPK1*; 大麦黄矮病毒外壳蛋白; 酵母双杂交; 双分子荧光互补; 蛋白互作

## Interaction between Wheat Resistance-related Kinase *TiDPK1* and BYDV Coat Protein

WANG Xin-Dong, CHEN Liang, and ZHANG Zeng-Yan\*

National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement / Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Triticeae Crops, Ministry of Agriculture / Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

**Abstract:** Yellow dwarf virus disease is one of the important diseases of wheat (*Triticum aestivum* L.) worldwide. It is caused by *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) that is vectored by aphids. A kinase protein encoding gene *TiDPK1*, which is derived from *Thinopyrum intermedium*, is an important gene involved in BYDV resistance in wheat-*T. intermedium* translocation lines. In this study, we used yeast two-hybrid and bimolecular fluorescence complementation assays to explore the relationship between *TiDPK1* and coat protein (CP) of BYDV (BYDV-CP). The results proved that the protein *TiDPK1* interacted with BYDV-CP, which may offer an insight to the resistance mechanism of *TiDPK1*.

**Keywords:** Wheat; Protein kinase *TiDPK1*; Coat protein of *Barley yellow dwarf virus*; Yeast two-hybrid; Bimolecular fluorescence complementation; Protein-protein interaction

黄矮病是由大麦黄矮病毒(*Barley yellow dwarf virus*, BYDV)引起的小麦病毒病, 在世界各地小麦产区均有发生, 我国西北、华北、西南、华东等近 20 个省、市、自治区的冬春麦区每年都有不同程度的病害, 造成小麦减产 5%~30%, 个别严重地块减产幅度超过 50%<sup>[1]</sup>, 目前除抗病品种外, 尚无其他有效的防治措施。优良的抗病资源是抗病育种的关键之一。小麦栽培品种中缺乏对黄矮病的有效抗源, 仅在少数材料中发现 1 个耐病基因<sup>[2]</sup>。偃麦草属(*Thinopyrum*)、冰草属(*Agropyron*)、赖草属(*Leymus*)、

披碱草属(*Elymus*)、鹅冠草属(*Roegneria*)中十余种小麦近缘植物对黄矮病免疫, 其中以中间偃麦草(*Th. intermedia*)被研究利用最多。国内外几个研究组分别将携带抗病基因的中间偃麦草染色体或染色体片段导入小麦背景, 育成抗黄矮病的小麦异源染色体系<sup>[3-5]</sup>。小麦-中间偃麦草易位系 YW642, 携带源自中间偃麦草 7X(7Ai-1)染色体长臂的抗黄矮病基因 *Bdv2*<sup>[6]</sup>, 抗 BYDV 的 PAV-Aus、-MAV、-GAV、-GPV 等多个株系。

BYDV 是一类正单链 RNA 病毒, 通过蚜虫传播,

本研究国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2012AA10A309, 2006AA100102)资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 张增艳, E-mail: zhangzengyan@caas.cn, Tel: 010-82108781

Received(收稿日期): 2013-02-05; Accepted(接受日期): 2013-04-22; Published online(网络出版日期): 2013-08-01.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20130801.1726.010.html>

可侵染小麦、大麦、燕麦、禾草等上百种植物。BYDV 与介体蚜虫间存在一定的专化性, 每种株系只能由 1 种或少数几种蚜虫传播。目前, 已将 BYDV-PAV、-PAS、和-GAV 株系划分为 *Luteovirus* 属, BYDV-RPV、-GPV 株系划分为 *Polerovirus* 属, 而 BYDV-SGV 和-RMV 株系在 *Luteovirus* 病毒科中尚未指定种属<sup>[7]</sup>。其中 PAV、PAS 是欧美国家小麦黄矮病的主流株系<sup>[8]</sup>, GPV 主要分布于我国及瑞典<sup>[9]</sup>, GAV 是我国黄矮病的主流株系<sup>[10]</sup>。近年来, 国内外分别完成了 BYDV-PAV<sup>[11-12]</sup>、-MAV<sup>[11]</sup>、-RPV<sup>[13]</sup>、-GAV<sup>[14]</sup>和-GPV<sup>[15]</sup>等株系的基因组测序。序列分析表明, BYDV-GAV 基因组包含 6 个开放阅读框(open reading frame, ORF), 分别编码 P1、病毒外壳蛋白(coat protein, CP)、运动蛋白(movement protein, MP)、依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)、传毒蛋白(aphid transmission protein)和 RNA 沉默抑制子(P6)<sup>[16]</sup>; BYDV-PAV 基因组也包含 6 个 ORF, 分别编码 P1、RdRp、传毒蛋白、CP、MP 和 RNA 沉默抑制子(P6), 但不同地区的 PAV 序列差异较大。BYDV 的 CP 可能是该病毒感染小麦的重要致病因子(与王锡锋研究员和刘艳博士的私人通讯)。

近年研究发现, 蛋白激酶识别病原效应因子或传递下游信号参与防御反应。水稻抗白叶枯病基因 *Xa21* 编码受体类蛋白激酶(RLK)、使野生稻具有抗 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 的性质<sup>[17]</sup>; 在马铃薯抗 *Pseudomonas syringae* 反应中, 蛋白激酶 Pto 能识别病原菌的效应因子(AvrPto 与 AvrPtoB), 并通过与抗病蛋白 Prf 互作共同抵御病原菌<sup>[18]</sup>; 簇毛麦抗白粉病重要基因 *STK-V* 编码丝氨酸和苏氨酸蛋白激酶基因, 为 *Pm21* 基因簇的关键成员, 使小麦-簇毛麦易位系具有白粉病抗性<sup>[19]</sup>。*TiDPK1* 是张增艳课题组从抗黄矮病易位系 YW642 中分离的一个蛋白激酶编码基因, 定位于易位的中间偃麦草染色体片段上。Virus-induced gene silencing (VIGS)功能分析表明, *TiDPK1* 是小麦-中间偃麦草易位系防御 BYDV 反应所需基因(未发表), 但其是否与 BYDV CP 互作目前还不知道。

研究蛋白相互作用的方法主要有酵母双杂交(yeast two-hybrid, YTH)、双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)、免疫共沉淀(coimmunoprecipitation, CO-IP)及 pull-down 等。YTH 的原理主要是基于对酵母转录因子

GAL4 性质的认识, 即将用于互作研究的 2 个基因分别与 GAL4 N-端的 DNA 结合域(DNA binding domain, BD)或 GAL4 C 转录激活域(activation domain, AD)融合、构建在表达载体上, 共同在特别改造的酵母菌株如 AH109<sup>(GAL4-)</sup>中表达融合蛋白。若 2 个融合蛋白互作, 功能重建的 GAL4 则能激活下游报告基因的表达, 使改造酵母菌株在各种缺陷型培养基上正常生长。因此在 YTH 实验中, 可通过对特异改造酵母菌株在各种缺陷型培养基上生长状况及 X- $\alpha$ -gal 颜色反应等来判定蛋白间的相互关系<sup>[20]</sup>。双分子荧光互补是 2002 年由 Hu 等<sup>[21]</sup>报道的用于直观、快速判断目标蛋白在活细胞中的定位及其互作的技术。该技术巧妙地将荧光蛋白分子的发光基团分成 2 个互补片段, 分别与其中一个目标蛋白融合表达, 共同转化细胞, 如果荧光蛋白恢复活性、表达荧光, 则表明 2 个目标蛋白具有相互作用。

本研究通过 YTH 和 BiFC 技术, 研究 *TiDPK1* 与 BYDV-GAV、-PAV 的 CP 间互作关系, 有助于探究和理解 *TiDPK1* 抗 BYDV 的作用机制, 对植物与微生物互作研究亦有一定的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

盆栽感黄矮病的小麦品系中 8601 (每盆 20 株, 共 2 盆)在温室中(昼 25℃, 14 h; 夜 15℃, 10 h)。至二叶一心期, 在幼苗基部叶鞘处分别接种带 BYDV-GAV 或 BYDV-PAV 的蚜虫(中国农业科学院植物保护研究所王锡锋研究员和刘艳博士提供), 各 20 株。约 35 d 后开始显症, 取感病(含 BYDV)叶片迅速放置液氮中速冻、-80℃ 保存。采用 TRIzol (Invitrogen)方法提取叶片总 RNA, 利用反转录试剂盒(TaKaRa DRR019)进行反转录获得第一链 cDNA, 用于克隆 BYDV-GAV、BYDV-PAV 的 CP 完整 ORF。

### 1.2 基因克隆

根据 BYDV-GAV (GenBank 登录号为 AY220739.1), BYDV-PAV (EU332308.1)基因组中 CP 序列, 设计克隆 BYDV-GAV 和-PAV 的 CP 的引物 GAV-CP-F、GAV-CP-R、PAV-CP-F 和 PAV-CP-R (表 1), 以含 BYDV 的中 8601 cDNA 为扩增模板, 应用高保真酶进行 PCR 扩增, 1%琼脂糖电泳分离获得 600 bp 扩增产物。回收 PCR 产物, 将其产物插入克隆载体 pMD18-T (TaKaRa D101), 转化至大肠杆菌 TOP10 感受态细胞中, 经过筛选、测序, 获得正确的

阳性克隆 pMD18-T-GAV-CP 和 pMD18-T-PAV-CP。*TiDPK1* (GenBank 登录号为 HQ423150)由本实验室克隆。

1.3 酵母双杂交载体的构建

为构建与 GAL4-BD 融合的 BYDV-GAV CP/-PAV CP的酵母表达载体, 设计了在这 2 个完整编码序列两端分别引入 *Bam*H I 与 *Pst* I 酶切位点的引物(表 1), 以 pMD18-T-GAV CP/-PAV-CP 质粒为模板、使用高保真酶扩增、获得加入上述酶切位点的 BYDV-GAV CP/-PAV CP 完整编码序列, 回收 PCR 扩增产物。利用 *Bam*H I、*Pst* I 双酶切上述 PCR 回收产物和酵母表达载体 pGBKT7 (Clontech)质粒, 用 T4 ligase 连接, 转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 经过筛选、测序, 获得正确的融合蛋白的酵母表达载体 pGBKT7-GAV-CP 和 pGBKT7-PAV-CP。以同样的方法将 *TiDPK1* 克隆到 AD 靶蛋白载体 pGADT7 (Clontech), 构建 *TiDPK1* 与 GAL4-AD 融合的酵母表达载体 pGADT7-*TiDPK1*。

1.4 BiFC 表达载体的构建

为将 *TiDPK1* 和 *BYDV-GAV CP* 完整的 ORF 分别融合到 BiFC 基础载体 pSYCE 和 pSYNE 载体中黄色荧光蛋白的 C 端一半、N 端一半片段上, 利用 Fast PCR Clone Kit (购买自 PUEX 公司)构建 BiFC 融合表达载体(图 2)。设计引物扩增 *TiDPK1* 和 *GAV-CP* 完整的 ORF, 将线性化载体 *Sac* I 酶切位点两端邻近 15 bp 载体序列分别引入上、下游引物, 选择内切酶 *Sac* I 分别消化骨架质粒 *pSYCE*、*pSYNE* (中国科学院植物研究所林金星研究员惠赠), 将回收 PCR 产物、线性化载体按 2 : 1 的比例混合, 加入 *FC* 重组酶, 室温反应 30 min, 冰上放置 5 min, 转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 经过筛选、测序, 获得正确的重组 BiFC 表达载体 pSYCE-*TiDPK1* 和

pSYNE-GAV-CP。

1.5 酵母双杂交分析

YTH 中所用酵母菌株为 AH109, 含有 *ADE2*、*HIS3*、*MEL1* 和 *LacZ* 等报告基因, 这些报告基因表达受 GAL4 调控。只有在与 GAL4-AD/-BD 融合的 2 个蛋白互作、GAL4 活性完整存在下, 酵母 AH109 细胞才能在与 *Ade*<sup>-</sup>/*His*<sup>-</sup>/*Leu*<sup>-</sup>/*Trp*<sup>-</sup> 缺陷性培养基上正常生长, 能把无色底物 X- $\alpha$ -gal 水解为蓝色产物。

将 AH109 菌株在 YPDA 固体培养基上划线培养 (30℃, 2~3 d), 挑选白色单克隆(直径 2 mm 左右)接种于 1 mL YPDA 液体培养基中, 30℃, 230 转 min<sup>-1</sup> 培养 8~12 h, 转接至 50 mL (于 250 mL 三角瓶)继续振荡培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.15~0.30。室温离心弃上清液, 将菌体重悬于 100 mL YPDA 液体培养基中培养直至 OD<sub>600</sub> 值为 0.6。室温离心, 弃上清液, 将菌体重悬于 60 mL 无菌水。室温离心, 弃上清液, 将菌体重悬于 3 ml 1.1 倍的 TE/LiAc 中, 短暂离心, 弃上清液, 菌种重悬于 600  $\mu$ L 1.1 $\times$ TE/溶液中, 获得了酵母感受态细胞, 立即用于转化实验。

提取 pGADT7-*TiDPK1*、pGBKT7-GAV-CP、pGBKT7-PAV-CP 等载体质粒、浓缩至 1  $\mu$ g  $\mu$ L<sup>-1</sup> 以上, 采用 PEG/LiAc 法转化酵母感受态细胞<sup>[22]</sup>。pGADT7-*TiDPK1*、pGBKT7-GAV-CP 与 pGBKT7-PAV-CP 单独转化, 用于毒理测试及自激活检验; pGADT7-*TiDPK1*+pGBKT7、pGADT7+pGBKT7-GAV-CP 和 pGADT7+pGBKT7-PAV-CP 用于对照实验; pGADT7-*TiDPK1*+pGBKT7-GAV-CP 和 pGADT7-*TiDPK1*+pGBKT7-PAV-CP 作为目标蛋白间互作分析的实验组。

1.6 BiFC 分析

取新鲜的黄皮洋葱内第 5 或第 6 层表皮细胞约 4~6 cm<sup>2</sup>, 内表皮朝下、紧贴于 MS 固体培养基中间

表 1 本研究中所用的引物序列  
Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	正向序列 Forward sequence (5'-3')	反向序列 Reverse sequence (5'-3')
GAV-CP	ATGAATTCAGTAGGCCGTAG	CTATTGGGAGTCATGTTGG
PAV-CP	ATGAATTCAGTAGGCCGTAG	CTATTGGCAGTCATTAGATG
YTH-GAV-CP	GCGGGATCCATGAATTCAGTAGGCCGTAG	GCGCTGCAGCTATTTGGGAGTCATGTTGG
YTH- PAV-CP	ATACCCGGGATGAATTCAGTAGGCCGTAG	ATACTGCAGCTATTTGGCAGTCATTAGATG
YTH- <i>TiDPK1</i>	ATACCCGGGATGATTGAGGGGGCAAGGTTTC	GCGGGATCCGCTGTCGGTGGTCATGGG
pSYNE-GAV-CP	GAAAAGTCGACATATATGAATTCAGTAGGCCGTAG	CCAGATCTGACTAGTCTATTTGGGAGTCATGTTGG
pSYCE- <i>TiDPK1</i>	GAAAAGTCGACATATATGATTGAGGGGGCAAGG	CCAGATCTGACTAGTTCAGTCGGTGGTCATGGG

位置, 避免产生气泡。密封后, 避光 30℃ 培养 4~5 h。提取 pSYCE-TiDPK1 和 pSYNE-GAV-CP 重组载体质粒, 各 3 μg 制作转化的金弹, 按照 PDS 1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad) 手册进行基因枪转化上述培养的洋葱表皮细胞。同时转化 4 组不同组合的质粒, pSYCE-TiDPK1+pSYNE-GAV-CP、pSYCE+pSYNE、pSYCE+pSYNE-GAV-CP 和 pSYCE-TiDPK1+pSYNE, 每组组合中质粒按等量混合(各 3 μg)。转化后的洋葱表皮细胞, 密封、避光 30℃ 培养约 16 h, 在共聚焦显微镜(Zeiss, LSM700) 513 nm 波长下观察黄色荧光信号。

## 2 结果与分析

### 2.1 酵母双杂交重组载体及 BiFC 重组表达载体

以含 BYDV 的中 8601 cDNA 作为模板, 扩增获得 BYDV-GAV CP 和 BYDV-PAV CP 完整 ORF, 大小为 600 bp (图 1)。序列比较结果表明, 与 GenBank 中注册的序列相比, BYDV-GAV CP 序列完全一致, 而 BYDV-PAV CP 序列一致性为 99%, 存在 2 个碱基的差异。

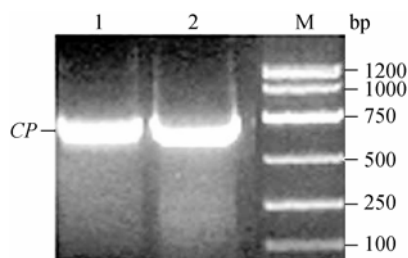


图 1 BYDV-GAV 和 BYDV-PAV 外壳蛋白(CP)基因开放阅读框的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR products of coat protein (CP) gene sequences of BYDV-GAV and BYDV-PAV

1: BYDV-GAV CP; 2: BYDV-PAV CP; M: marker II.

将 *TiDPK1* 和 BYDV-GAV CP/-PAV CP 的全长 ORF 分别构建到 YTH 载体 pGADT7, pGBKT7 中, 获得重组表达载体 pGADT7-TiDPK 和 pGBKT7-GAV-CP/-PAV-CP (图 2-A)。

将 *TiDPK1* 和 *GAV CP* 完整的 ORF 分别融合到 BiFC 基础载体 pSYCE、pSYNE 载体中黄色荧光蛋白的 C 端一半、N 端一半上, 获得 BiFC 融合表达载体 pSYCE-TiDPK1 和 pSYNE-GAV-CP (图 2-B)。

### 2.2 酵母双杂交分析 *TiDPK1* 与 *GAV CP*/-PAV CP 间互作

将 pGADT7-TiDPK1 与 pGBKT7-GAV-CP 或 pGBKT7-PAV-CP 转化的酵母菌株分别涂布于

SD/-Leu 和 SD/-Trp 固体培养基, 30℃、培养 2 d, 挑取单克隆于 SD/-Leu/Amp<sup>+</sup>和 SD/-Trp/Kan<sup>+</sup>液体培养基中进行毒理检测。30℃下 230 转 min<sup>-1</sup> 培养过夜, 经检测, 培养基 OD<sub>600</sub> 值为 0.923 (>0.8), 表明 pGADT7-TiDPK1、pGBKT7-GAV-CP 与 pGBKT7-PAV-CP 表达的融合蛋白对酵母细胞无毒副作用。

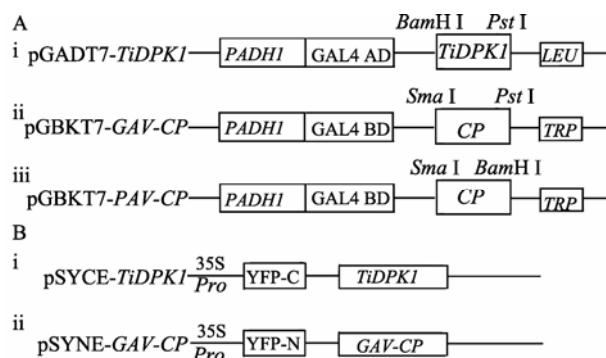


图 2 酵母双杂交系统(A)及 BiFC 系统(B)中 *TiDPK1* 和 BYDV CP 的表达载体示意图

Fig. 2 Scheme of *TiDPK1* and CP expression vectors in YTH (A) and BiFC (B)

将 pGADT7-TiDPK1 和 pGBKT7-GAV-CP/-PAV-CP 转化的酵母菌株分别涂布于 SD/-Leu 和 SD/-Trp 固体平板, 30℃ 培养 2 d, 挑取单克隆于 0.5 mL YPD 液体培养基中。30℃下 230 转 min<sup>-1</sup> 培养过夜, 稀释后分别涂布于营养缺陷性 SD/-Leu/-His 和 SD/-Trp/-His 固体平板(添加 30 mmol L<sup>-1</sup> 3AT, 3-amino-1,2,4-triazole, 自激活抑制剂)。30℃倒置培养 3 d, 均未出现生长细胞, 表明 pGADT7-TiDPK1、pGBKT7-GAV-CP 和 pGBKT7-PAV-CP 转化的酵母无自激活现象, 可用于后续实验。

将对照组和实验组重组质粒转化的酵母分别涂布于 SD/-Leu/-Trp 固体平板。30℃、培养 3 d, 所有菌落正常生长。将上述单克隆的菌液涂布于含 3AT 的 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 四缺营养缺陷性固体平板上(添加 30 mmol L<sup>-1</sup> 3AT 以增加可靠性。3AT 是 HIS3 产物竞争抑制剂, 只有 HIS3 高表达酵母才能成活), 30℃下培养 3 d 后, pGADT7-TiDPK1+pGBKT7-GAV-CP 及 pGADT7-TiDPK1+pGBKT7-PAV-CP 转化的菌株开始出现菌落, 5 d 后上述实验组的菌落生长良好(图 3), 而 pGADT7-TiDPK1+pGBKT7、pGADT7+pGBKT7-GAV-CP 和 pGADT7+pGBKT7-PAV-CP 等对照菌株均未正常生长, 初步说明 *TiDPK1* 蛋白能够与 BYDV-GAV、-PAV 的 CP 互作。将对照组和实验组的酵母分别涂布于含 X-α-gal

的 YPD 固体培养基上, 结果对照组菌落无颜色变化, 而 pGADT7-TiDPK1+pGBKT7-GAV-CP 与 pGADT7-TiDPK1+pGBKT7-PAV-CP 实验组菌落变蓝(实验 2 h 后开始变蓝, 6 h 后深蓝), 进一步表明 TiDPK1 在酵母双杂交系统内与 BYDV-GAV 和 BYDV-PAV 的 CP 具有相互作用(图 3)。

### 2.3 BiFC 分析 TiDPK1 与 BYGA-GAV CP 相互作用

利用基因枪将 4 种组合质粒(pSYCE+pSYNE、

pSYCE+pSYNE-GAV-CP、pSYCE-TiDPK1+pSYNE、pSYCE-TiDPK1+pSYNE-GAV-CP) 共转化至洋葱表皮细胞中, 瞬时表达。共聚焦荧光显微镜检测黄色荧光信号。结果表明, 共同转化 pSYCE-TiDPK1+pSYNE-GAV-CP 的洋葱表皮细胞能表达 YFP 荧光信号(图 4-A), 而三组对照质粒的洋葱表皮细胞在共聚焦显微镜中检测不到 YFP 荧光信号(图 4-B, -C, -D), 进一步证明 TiDPK1 与 BYDV-GAV-CP 能相互作用。

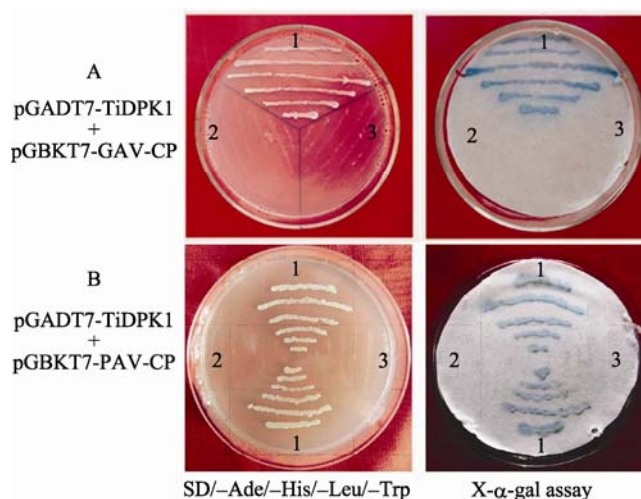


图 3 酵母双杂交系统检验 TiDPK1 与 BYGA-GAV CP/PAV CP 交互

Fig. 3 BYDV-GAV CP/PAV CP interacts with TiDPK1 in the YTH system

1: 转化实验组质粒(pGADT7-TiDPK1+pGBKT7-GAV-CP, pGADT7-TiDPK1+pGBKT7-PAV-CP)的酵母在四缺营养选择培养基上生长良好, 在 X-α-gal 定性实验变蓝; 2 和 3: 转化对照组质粒的酵母(pGADT7-TiDPK1+pGBKT7、pGADT7+pGBKT7-GAV-CP 和 pGADT7+pGBKT7-PAV-CP)不能在四缺培养基上生长, 同时 X-α-gal 定性实验无颜色变化。

1: Yeast colonies containing pGBKT7-CP/pGADT7-TiDPK1 grew well on SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp medium and turned blue in X-α-gal assays; 2 and 3: Yeast colonies containing controls plasmids unable to grow on SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp medium and turned blue in X-α-gal assays.

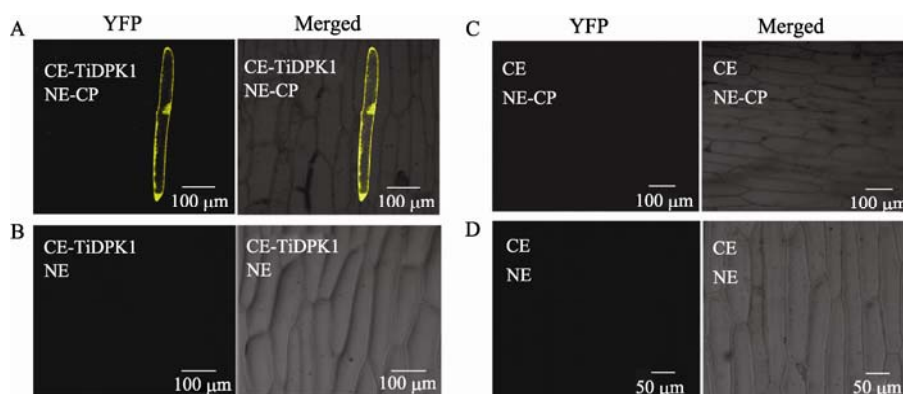


图 4 BiFC 重组质粒共转化洋葱表皮细胞的共聚焦荧光及明场图像

Fig. 4 Fluorescence and merged with bright-field images for the indicated proteins transiently expressing in onion epidermal cells

A: pSYCE-TiDPK1(CE-TiDPK1), pSYNE-GAV-CP (NE-CP); B: pSYCE-TiDPK1 (CE-TiDPK1)+pSYNE (NE); C: pSYCE (CE)+pSYNE-GAV-CP (NE-CP); D: pSPYNE (NE)+pSPYCE (CE).

### 3 讨论

植物在长期进化中形成精细的内在免疫系统, 以抵御入侵的病原微生物。植物通过细胞表面的 pattern recognition receptors (PRRs) 感知保守的病原相关分子 (pattern-associated molecular patterns, PAMPs), 诱导产生初级的主动防御反应——表型激发免疫 (PAMP-triggered immunity, PTI)。然而, 病原微生物又进化出抑制植物 PTI 的方法, 如通过分泌效应子 (effector) 到植物细胞内; 一旦病原获得抑制植物初级防御的能力, 植物即发展出第二层免疫反应——效应子激发免疫 (effector-triggered immunity, ETI), 主要由 *R* 基因编码蛋白产物直接识别或间接识别相应的病原微生物效应子, 激活防御反应信号、产生超敏反应和一系列防御反应物质, 最终产生抗病性<sup>[23]</sup>。蛋白激酶作为识别病原 PAMPs 的受体、辅助蛋白或传递信号的重要因子, 在植物抗病防御反应中具有重要作用<sup>[24]</sup>。

张增艳课题组发现 TiDPK1 蛋白激酶, 分布于细胞膜和细胞核中 (待发表), 暗示其具备接收或传递病原信号的潜能。BYDV CP 为黄矮病毒感染小麦的主要致病因子。因此, 研究 TiDPK1 与 BYDV CP 之间的关系, 对研究 *TiDPK1* 的作用机制具有重要意义。YTH 技术在研究植物抗病基因与病原物互作中被广泛应用。利用该技术已发现 Pto 与 AvrPto<sup>[25]</sup>、RRS1-R 全长蛋白与 PopP2<sup>[26]</sup> 及 RIN4 与 AvrB 或 AvrRpm1<sup>[27]</sup> 存在互作, RIN4 与 AvrB 或 AvrRpm1 互作为 RPM1 介导的抗病反应所必需<sup>[27]</sup>。尽管 YTH 具有操作简单、结果明显等优点, 但在实验中难以彻底避免假阳性或假阴性结果, 因此相关结果常需用其他技术的实验验证。近年来, BiFC 技术亦在植物与病原物互作研究中被广泛应用。同时使用 YTH 系统和 BiFC 系统, 能进一步降低假阳性, 为后续试验提高可靠的依据。Bar 等<sup>[28]</sup> 通过 YTH 及 BiFC 分析, 证明 BAK1 与 LeEix1 互作, 在烟草及马铃薯中促进了 LeEix2 对病原效应子 EiX 的反应; Burch-Smith 等<sup>[29]</sup> 通过 BiFC、细胞生物化学和免疫共沉淀分析, 发现烟草抗病蛋白 N 与 TMV 病毒效应子 p50 互作, 并进一步指明 N 蛋白中的 TIR 亚结构域是二者互作所必需的。Wang 等<sup>[30]</sup> 通过 YTH 及 BiFC 等分析, 证明拟南芥抗病蛋白 RPW8.2 通过与 PAPP2C 互作, 进而防御白粉菌。本研究通过 YTH 证明 TiDPK1 能与 BYDV-GAV-CP、BYDV-PAV-CP

互作, 通过及 BiFC 系统进一步验证该实验结果。BYDV 的 CP 是重要的致病因子, 本文通过 YTH 和 BiFC 实验证明 TiDPK1 可与 BYDV CP 互作, 为 *TiDPK1* 抗 BYDV 作用机制提供重要依据。

### 4 结论

酵母双杂交实验结果和双分子荧光互补实验结果表明, TiDPK1 蛋白激酶能与 BYDV-GAV、-PAV 的 CP 互作。

致谢: 感谢中国农业科学院植物保护研究所王锡锋研究员和刘艳博士提供带 BYDV 的蚜虫、中国科学院植物研究所林金星教授惠赠 BiFC 基础载体。

### References

- [1] Zhang Z Y, Lin Z S, Xin Z Y. Research progress in BYDV resistance genes derived from wheat and its wild relatives. *J Genet Genomics*, 2009, 36: 567–573
- [2] Singh R P. Genetic association of gene *Bdv1* for tolerance to barley yellow dwarf virus with gene *Lr34* and *Yr18* for adult plant resistance to rusts in bread wheat. *Plant Dis*, 1993, 77: 1103–1106
- [3] Xin Z Y, Xu H J, Chen X, Lin Z S, Zhou G H, Qian Y T, Cheng Z M, Larkin P J, Banks P, Appels R, Glarke B, Brettell R S I. Development of common wheat germplasm resistant to *Barley yellow dwarf virus* by biotechnology. *Sci China (Ser B)*, 1991, 34(9): 1055–1062
- [4] Sun S C. The approach and methods of breeding new varieties and new species from *Agrotriticum* hybrids. *Acta Agron Sin (作物学报)*, 1981, 7(1): 51–55 (in Chinese with English abstract)
- [5] Sharma H, Ohm H, Perry K L. Registration of *Barley yellow dwarf virus* resistant wheat germplasm line P29. *Crop Sci*, 1997, 37: 1032–1033
- [6] Zhang Z, Xin Z, Ma Y, Chen X, Xu Q, Lin Z. Mapping of a BYDV resistance gene from *Thinopyrum intermedium* in wheat background by molecular markers. *Sci China C (Life Sci)*, 1999, 42: 663–668
- [7] Milller W A, Rasochova L. Barley yellow dwarf viruses. *Annu Rev Phytopathol*, 1997, 35: 167–190
- [8] Jarošová J, Chrpová J, Šíp V, Kundu J K. A comparative study of the *Barley yellow dwarf virus* species PAV and PAS: distribution, accumulation and host resistance. *Plant Pathol*, 2013, 62: 436–443
- [9] Kvarnheden A. Viruses of field crops—an overview. Risk assessment/risk management, forecasting pests and diseases of field crops in a changing climate-control strategies for pests, diseases and weeds. In: NJF Seminar, Sweden, 2011. 446: 53–58
- [10] Zhou G H, Zhang S X, Rochow W F. Identification of a barley yellow dwarf luteovirus strain transmitted by *Macrosiphum ave-*



- nae* and *Schizaphis graminum*. *Acta Phytopath Sin* (植物病理学报), 1986, 16: 17–22 (in Chinese)
- [11] Ueng P P, Vincent J R, Kawata E E, Lei C H, Lister R M, Larkins B A. Nucleotide sequence analysis of the genomes of the MAV-PS1 and P-PAV isolates of *Barley yellow dwarf virus*. *J Gen Virol*, 1992, 73: 487–492
- [12] Wu B L, Alexandra L B, Liu Y, Zhou G H, Wang X F, Elena S F. Dynamics of molecular evolution and phylogeography of *Barley yellow dwarf virus*-PAV. *PLoS ONE*, 2011, 6: e16896
- [13] Vincent J R, Lister R M, Larkins B A. Nucleotide sequence analysis and genomic organization of the NY-RPV isolate of *Barley yellow dwarf virus*. *J Gen Virol*, 1991, 72: 2347–2355
- [14] Jin Z B, Wang X F, Chang S, Zhou G H. The complete nucleotide sequence and its organization of the genome of *Barley yellow dwarf virus*-GAV. *Sci China: Ser C* (Life Sci), 2004, 47: 175–182
- [15] Zhang W W, Cheng Z M, Xu L, Wu M S, Waterhouse P, Zhou G H, Li S F. The complete nucleotide sequence of the barley yellow dwarf GPV isolate from China shows that it is a new member of the genus Polerovirus. *Arch Virol*, 2009, 154: 1125–1128
- [16] Liu Y, Zhai H, Zhao K, Wu B B, Wang X F. Two suppressors of RNA silencing encoded by cereal-infecting members of the family Lutroviridae. *J Gen Virol*, 2012, 93: 1825–1830
- [17] Song W Y, Wang G L, Chen L L, Kim H S, Pi L Y, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai W X, Zhu L H. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, 1995, 270: 1804–1806
- [18] 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. *EMBO J*, 1997, 16: 3207–3218
- [19] Cao A, Xing L, Wang X, Yang X, Wang W, Sun Y, Qian C, Ni J, Chen Y, Liu D, Wang X E, Chen P. Serine/threonine kinase gene *Stpk-V*, a key member of powdery mildew resistance gene *Pm21*, confers powdery mildew resistance in wheat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 7727–7732
- [20] Bendixen C, Gangloff S, Rothstein R. A yeast mating-selection scheme for detection of protein–protein interactions. *Nucl Acids Res*, 1994, 22: 1778–1779
- [21] Hu C D, Chinenov Y, Kerppol T. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell*, 2002, 9: 789–798
- [22] Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, 1983, 162: 1142–1150
- [23] Jones J D, Dangl J L. The plant immune system. *Nature*, 2006, 444: 323–332
- [24] Stephen T, Chisholm, Gitta C, Brad D, Brain J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 2006, 124: 803–814
- [25] Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Dong X F, Khounloham M, Boucher C, Somssich I, Genin S, Marcos Y. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 8024–8029
- [26] Mackey D, Holt B F, Wiig A, Dangl J L. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Cell*, 2002, 108: 743–754
- [27] Kodama Y, Hu C D. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives. *BioTechniques*, 2012, 53: 285–298
- [28] Bar M, Sharfman M, Ron M, Avni A. BAK1 is required for the attenuation of ethylene-inducing xylanase (Eix)-induced defense responses by the decoy receptor LeEix1. *Plant J*, 2000, 63: 791–800
- [29] Burch-Smith T M, Schiff M, Caplan J L, Tsao J, Czymmek K, Dinesh-Kumar S P. A novel role for the TIR domain in association with pathogen-derived elicitors. *PLoS Biol*, 2007, 5: e68
- [30] Wang W M, Ma X F, Zhang Y, Luo M C, Wang G L, Bellizzi M, Xiong X Y, Xiao S Y. PAPP2C interacts with the atypical disease resistance protein RPW8.2 and negatively regulates salicylic acid-dependent defense responses in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2012, 5: 1125–1137