

引文格式: 孔一浙, 乔梁, 王蕙羽棠, 等. 小麦 4 个 *WAKs/WAKLs* 基因的分子特征及其响应条锈菌侵染的表达[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2024, 39(1): 26–34. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202304056](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202304056)

小麦 4 个 *WAKs/WAKLs* 基因的分子特征及其 响应条锈菌侵染的表达*

孔一浙, 乔梁, 王蕙羽棠, 刘星辰, 杨宝菊**
(云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 【目的】鉴定 4 个小麦 *WAKs/WAKLs* 基因, 研究其响应条锈菌 (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) 侵染的表达模式。【方法】从小麦条锈病抗病材料云 337 和感病材料云 402 转录组差异表达的基因中筛选出 4 个 *WAKs/WAKLs* 基因, 对其基因结构、蛋白质理化性质、保守结构域和进化进行分析, 通过 RT-qPCR 验证 4 个基因在小麦接种条锈菌后的表达模式。【结果】所鉴定的 *TraesCS1B02G004100*、*TraesCS6B02G459100*、*TraesCSU02G079300* 和 *TraesCS3A02G122300* 基因长度分别为 3 194、5 117、3 208 和 2 934 bp, 分别编码 714、960、737 和 652 个氨基酸, 均包括胞外 GUB 结构域和胞内激酶结构域, 均位于细胞膜。系统进化分析表明: *TraesCS6B02G459100* 与水稻 *Os05g04460*、*TraesCSU02G079300* 与水稻 *Os02g02120*、*TraesCS3A02G122300* 与拟南芥 *AtWAKL15*、*TraesCS1B02G004100* 与大麦 *HORVU.MOREX.r3.5HG0503880* 的亲缘关系分别最近。激酶部位氨基酸序列分析表明: *TraesCS1B02G004100* 和 *TraesCSU02G079300* 为与植物先天免疫机制相关的非 RD 激酶, *TraesCS6B02G459100* 和 *TraesCS3A02G122300* 为 RD 激酶。基因表达分析表明: 4 个 *WAKs/WAKLs* 基因在小麦接种条锈菌后均差异表达, 其中 *TraesCS1B02G004100* 在抗病材料中的表达被抑制、在感病材料中不表达。【结论】*TraesCS3A02G122300* 和 *TraesCSU02G079300* 在小麦与条锈菌亲和及非亲和互作体系中均差异表达; *TraesCS6B02G459100* 和 *TraesCS1B02G004100* 仅在非亲和互作中特异表达。非 RD 激酶 *TraesCS1B02G004100* 表达受到抑制, 其调控抗病性的功能和机制需进一步研究。

关键词: 小麦; *WAKs/WAKLs* 基因; 表达分析; 条锈菌

中图分类号: S512.101

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2024) 01-0026-09

Molecular Characteristics of Four *WAKs/WAKLs* Genes in Wheat and Their Expression in Response to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* Infection

KONG Yixi, QIAO Liang, WANG Huiyutang, LIU Xingchen, YANG Baoju

(College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] To identify four wheat *WAKs/WAKLs* genes and analyze their expression patterns responding to *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* (*Pst*) infection. [Methods] Four *WAKs/WAKLs* genes were screened from transcriptome differentially expressed genes of wheat, which inoculated *Pst* in resistant variety Yun337 and susceptible variety Yun402. The gene structure, physicochemical

收稿日期: 2023-04-19

修回日期: 2024-03-04

网络首发日期: 2024-03-26

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (32160481); 云南省“兴滇英才支持计划”青年人才项目。

作者简介: 孔一浙 (2000—), 女, 云南玉溪人, 在读硕士研究生, 主要从事小麦条锈病抗病研究。

E-mail: kyl15974980647@163.com

**通信作者 Corresponding author: 杨宝菊 (1982—), 女, 陕西汉中人, 博士, 副教授, 主要从事作物遗传育种、病原菌与植物互作研究。E-mail: yangbaoju@nwsuaf.edu.cn

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/53.1044.S.20240325.1744.004>



property of protein, conserved domains and phylogenetic relationship were analyzed, and the expression patterns of four genes in wheat inoculated *Pst* were verified by RT-qPCR. [Results] The full lengths of *TraesCS1B02G004100*, *TraesCS6B02G459100*, *TraesCSU02G079300*, and *TraesCS3A02G122300* were 3 194, 5 117, 3 208, and 2 934 bp, respectively; they encoded 714, 960, 737 and 652 amino acids, respectively; they all included extracellular GUB domain and intracellular Ser/Thr kinase domain; and they were all located on the cell membrane. Phylogenetic analysis showed that *TraesCS6B02G459100* with *Os05g04460*, *TraesCSU02G079300* with *Os02g02120*, *TraesCS3A02G122300* with *AtWAKL15*, *TraesCS1B02G004100* with *HORVU.MOREX.r3.5HG0503880*, had a close relationship, respectively. The kinase site amino acid analysis showed that *TraesCS1B02G004100* and *TraesCSU02G079300* were non-RD kinases related to plant innate immune mechanism, while *TraesCS6B02G459100* and *TraesCS3A02G122300* were RD kinases. Gene expression analysis showed that four *WAKs/WAKLs* genes in wheat were expressed differently upon infection of *Pst*, and *TraesCS1B02G004100* was down-regulated in resistant variety but scarcely expressed in susceptible variety. [Conclusion] *TraesCS3A02G122300* and *TraesCSU02G079300* are expressed differently in both compatible and incompatible interactions between wheat and *Pst*; *TraesCS6B02G459100* and *TraesCS1B02G004100* are only respectively expressed in incompatible interaction. The expression of non-RD receptor kinase gene *TraesCS1B02G004100* is inhibited, and its function and mechanism in disease resistance deserve further investigation.

Keywords: *Triticum aestivum*; *WAKs/WAKLs* gene; expression analysis; *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*

类受体激酶 (receptor-like kinase, RLK) 是植物受体最主要的组成成分, 在细胞间的跨膜转导信号中起重要作用, 控制植物的繁殖、生长、发育及对各种环境的适应^[1]。RLK 家族一般包含胞外结构域 (extracellular domain, ED)、跨膜区 (transmembrane region, TM) 和胞内激酶结构域 (Ser/Thr kinase domain, STK)^[2]。在植物病原菌互作的信号转导通路中, RLK 作为模式识别受体 (pattern-recognition receptors, PRRs) 可以识别病原菌分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 从而在细胞膜上响应植物的天然免疫系统 (pattern-triggered immunity, PTI), 激活植物的抗病能力^[3-5]。当外界信号 PAMPs 分子被受体类激酶的 ED 识别后, 通过 STK 将信号传导给下游的信号通路, 引发一系列免疫反应, 包括 ROS 爆发、MAPK 激活、胼胝质沉淀、钙离子流入、水杨酸积累等^[3-5]。如油菜素内酯信号转导通路中, 共受体 BAK1 和受体 FLS2 共同识别病原菌的鞭毛蛋白, BRI1 受体类激酶和 BAK1 相互作用并经交互磷酸化形成 1 个活跃的受体复合物, 从而激活油菜素内酯抵御病原菌。越来越多的 RLKs

已被证明是 PRRs^[3-5]。

细胞壁受体激酶 (wall-associated kinases, WAK) 及其类基因 *WAKLs* (WAK like genes, WAKLs) 属于 RLK 家族的亚家族^[6], 合称为 WAK/WAKL 家族。*WAKs* 和 *WAKLs* 的结构非常相似, 主要是胞外表皮生长因子结构域 (epidermal growth factor domain, EGF)、跨膜结构域和胞内 STK, 但部分 *WAKLs* 缺少一些结构域, 如 *WAKL7* 缺少跨膜域和激酶结构域^[7]。在植物防御反应中, 拥有胞外结构域的 *WAKs/WAKLs* 基因可以作为细胞外界信号接收员, 而胞内激酶部位参与胞质信号级联反应^[7], 并且在生长发育和对非生物压力的耐受性中起作用。*WAKs/WAKLs* 基因在植物防御病原体方面发挥着关键作用, 如: *AtWAK1* 编码 *WAKs* 蛋白, 与病原菌互作, 在拟南芥的防御反应中起重要作用^[8]; 从玉米 (*Zea mays* L.) 中克隆的主效数量性状基因 *ZmWAK* 可抗玉米丝黑穗病^[9]; 在棉花 (*Gossypium hirsutum* L.) 中鉴定到的 *GhWAK7A* 参与调节对镰刀菌和黄萎病的反应^[10]; 在山新杨 (*Populus davidiana* × *P. bolleana*) 中过表达克隆到 *PdPapWAK* 基因后, 其抵抗非生物和生物胁迫

迫的能力进一步增强^[11]。

植物 *WAK/WAKL* 家族是响应病原菌信号的重要成员。长久以来, 基因对基因假说提供了植物抗病模式 PTI 与 ETI 系统、植物 PRRs 与抗病基因 (resistance gene, *R*) 的明确界限, 但这一界限面临着大量研究的挑战。*WAK/WAKL* 家族作为信号转导途径中的重要受体, 可以激活植物的 PTI 免疫反应模式, 检测到病原菌的效应蛋白, 可能原因之一是其在植物 *R* 基因与病原菌无毒基因互作过程中发挥“监测”作用^[12-13]。在小麦对禾谷丝核菌的防御反应中, 鉴定到 *WAK7* 的转录丰度升高^[14], 积极响应了小麦禾谷丝核菌的防御反应。小麦基因组中定位到 1 个 *WAKL4/stb6* 基因, 该基因识别病原菌效应物 Avr Stb6, 且绕过过敏性反应赋予小麦对枯叶病的抗性, 符合基因对基因假说^[15]。当过表达 *OsWAK9I* 时, 水稻激活 ETI 系统, 产生 H_2O_2 反应并增强相关 *R* 基因的表达^[16]。*SIWAKI* 通过番茄中的 FLS2/FLS3 复合物参与调节 PRRs 介导的免疫应答^[17]。总之, *WAK/WAKL* 家族在 PTI 和 ETI 系统中的调控机制很复杂, 具体情况尚不清楚。

本研究从课题组前期测定的小麦响应条锈病侵染的转录组数据中筛选出 4 个在抗感材料中差异表达的 *WAKs/WAKLs* 基因, 对其进行基因结构、蛋白基本理化性质、保守结构域、系统进化等生物信息学分析, 结合实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 在抗病和感病材料中分析其响应条锈菌的表达模式, 为进一步研究小麦 *WAKs/WAKLs* 基因响应条锈菌的侵染作用机制及功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试小麦品种为抗条锈病品种云 337 和感条锈病品种云 402; 小麦条锈菌 (*Puccinia striiformis* f.sp.*tritici*) 为 CYR32。将小麦播种在人工培养室中, 温度控制在昼 16~18 °C、夜 12~15 °C, 每天光照 16 h; 当小麦生长到二叶期时, 将 CYR-32 与滑石粉按体积比 1 : 20 混合后进行撒粉接种; 分别采集条锈菌侵染后 0、24、48、72、120 和 168 h 的叶片样本, 于 -80 °C 保存备用。

1.2 转录组测序及差异基因表达分析

转录组测序由北京百迈客生物科技有限公司完成。文库质检合格的测序数据采用 DESeq2 进

行差异基因分析, 以差异倍数 (fold change, FC) ≥ 1.5 且错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.01 作为差异基因筛选标准, 从中挖掘在抗感材料中差异表达的小麦 *WAKs/WAKLs* 基因, 并对其进行 COG 分类、GO 功能富集、KEGG 注释和 KEGG 通路富集分析。

1.3 小麦 *WAK/WAKL* 家族基因鉴定

下载拟南芥、水稻、大麦和小麦基因组数据库文件, 采用 TBtools v1.108 从中比对出差异常表达的小麦 *WAKs/WAKLs* 基因的同源基因组和氨基酸序列, 并筛选同源性较高的基因; 利用 NCBI 的 Batch CD-Search 在线软件 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对筛选得到的候选基因编码蛋白进行蛋白结构域分析。

1.4 小麦 *WAK/WAKL* 家族成员生物信息学分析

利用 GSDS 在线软件 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 分析和绘制小麦 *WAKs/WAKLs* 基因结构; 利用 ExPASyProtParam Tool (<http://web.expasy.org/protparam>) 预测蛋白质的等电点和分子质量; 利用 ExPASy (<http://web.expasy.org/protscale>) 预测蛋白质的亲水性和疏水性; 利用 MEME 在线软件 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 预测蛋白基序。为了研究小麦 *WAKs/WAKLs* 蛋白与其他物种间的系统进化关系, 对小麦、大麦、拟南芥和水稻 4 个物种中同源性较高的 *WAKs/WAKLs* 蛋白全长序列进行比对, 采用 DNAMAN V6 比对蛋白质多序列, 采用 MEGA 7.0 的邻接法构建系统进化树, 采用 TBtools 绘制系统进化树与基序预测图。

1.5 小麦 *WAKs/WAKLs* 基因的表达模式分析

根据从转录组筛选出的小麦 *WAKs/WAKLs* 基因序列, 使用 Beacon Designer 8 设计 RT-qPCR 引物序列 (表 1), 引物由北京擎科生物股份有限公司合成。采用 RNA Easy Fast 植物组织 RNA 快速提取试剂盒 (天根生化科技有限公司) 提取小麦叶片的总 RNA, 再采用 Aid lab 公司反转录试剂盒 (Ture script 1st Stand cDNA SYNTHESIS Kit) 进行反转录。以小麦 *GAPDH* 基因为内参, 使用 2 $\times$ SYBR[®] Green 预混液 (中国 DF) 试剂盒在 Analytikjena-qTOWER2.2 型荧光定量 PCR 仪 (德国) 上进行 RT-qPCR 反应。反应体系总体积 10.0 μ L, 包括 cDNA 模板 1.0 μ L, SYBR Green 1 Master 5.0 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, ddH₂O 3.0 μ L。

表 1 供试引物
Tab. 1 Primers for test

引物名称 primer names	引物序列 (5'→3') primer sequences
<i>GAPDH</i> -F	GCCTTGCTCCTCTTGCTA
<i>GAPDH</i> -R	TCCACCTCTCCAGTCCTT
<i>TraesCS1B02G004100</i> -F	CAATCAGCGGACGGTCTA
<i>TraesCS1B02G004100</i> -R	ATGTCGCCGATGACTTGT
<i>TraesCS6B02G459100</i> -F	TTCATCGGAATGTGGTCAAG
<i>TraesCS6B02G459100</i> -R	GCTGAGTGGAGATAAGAAAGG
<i>TraesCSU02G079300</i> -F	GAGATGTCGCTGAGAGGTT
<i>TraesCSU02G079300</i> -R	CCATGCTGTCCAGTGCTA
<i>TraesCS3A02G122300</i> -F	AGCTCGACACAATGAAGG
<i>TraesCS3A02G122300</i> -R	CCCAGCCTCAATGTTGAT

反应程序为: 95 ℃ 3 min; 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 30 s, 39 个循环, 溶解曲线 (60~95 ℃, 每个循环增加 1 ℃, 每次循环时间为 4 s) 设置 2 个生物学重

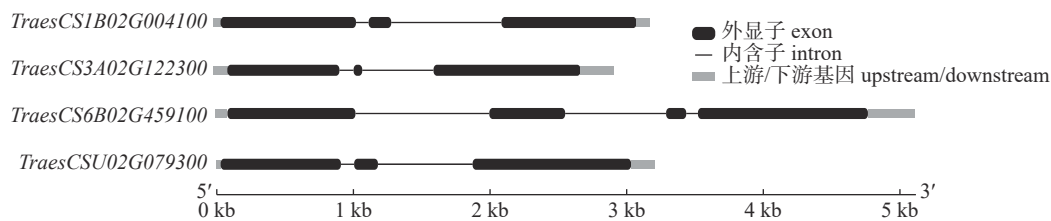


图 1 4 个小麦 *WAKs/WAKLs* 基因的结构

Fig. 1 Gene structure of four wheat *WAKs/WAKLs* genes

2.2 *WAKs/WAKLs* 蛋白的理化性质和亚细胞定位
由表 2 可知: *TraesCS1B02G004100*、*TraesCS6B02G459100*、*TraesCSU02G079300* 和 *TraesCS3A02G122300* 编码的氨基酸序列长度分别为 714、960、737 和 652 aa; 蛋白分子质量分别为 78.68、106.29、81.86 和 69.67 ku; 理论等电点分别为 8.50、5.98、5.65 和 6.25; 脂肪族氨基酸指数分别为 89.59、85.33、81.38 和 90.49; 4 个基因的蛋白亲疏水性值均为负值, 为亲水性蛋白。亚细胞定位预测显示: 4 个基因均定位于细胞膜上, 为膜蛋白。

复, 并使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [18] 计算各个样品及各组中的基因相对表达量。采用 Excel 2010 处理数据; 采用 GraphPad Prism 8.4.2 作图。

2 结果与分析

2.1 4 个 *WAKs/WAKLs* 基因的结构

经转录组筛选出 4 个小麦 *WAKs/WAKLs* 基因, 分别为 *TraesCS1B02G004100*、*TraesCS6B02G459100*、*TraesCSU02G079300* 和 *TraesCS3A02G122300* 基因 (图 1)。其中, 基因组序列最长的是 *TraesCS6B02G459100*, 长度为 5 117 kb, 包含 4 个外显子和 3 个内含子; 序列最短的是 *TraesCS3A02G122300*, 长度为 2 934 kb, 包含 3 个外显子和 2 个内含子; *TraesCSU02G079300* 和 *TraesCS1B02G004100* 的长度相近, 分别为 3 208 和 3 194 bp, 均包含 3 个外显子和 2 个内含子。

2.3 *WAKs/WAKLs* 的系统进化以及基序和功能结构域

小麦、大麦、拟南芥和水稻中同源性较高的 43 个 *WAKs/WAKLs* 蛋白质序列按照亲缘关系被分为 4 个分支, *TraesCS6B02G459100* 和来自水稻、大麦、拟南芥的成员聚为一类, 处于分支 I, 且与水稻 *Os05g04460* 亲缘关系最近; *TraesCSU02G079300* 和 *TraesCS3A02G122300* 处于分支 II, 分别与水稻 *Os02g02120*、拟南芥 *AtWAKL15* 亲缘关系最近; *TraesCS1B02G004100* 处于分支 III, 与大麦 *HORVU.MOREX.r3.5HG0503880* 亲缘关系

表 2 4 个 *WAKs/WAKLs* 基因理化性质
Tab. 2 Physicochemical properties of four *WAKs/WAKLs* genes

基因 gene	蛋白质序列号 accession number of protein	多肽长度/aa peptide length	蛋白分子质量/ku protein molecular weight	等电点 pI	氨基酸指数 amino acid index	蛋白亲水性 protein hydrophilicity
<i>TraesCS1B02G004100</i>	XP_044361219.1	714	78.68	8.50	89.59	-0.119
<i>TraesCS6B02G459100</i>	XP_044410226.1	960	106.29	5.98	85.33	-0.120
<i>TraesCSU02G079300</i>	XP_044407301.1	737	81.86	5.65	81.38	-0.214
<i>TraesCS3A02G122300</i>	XP_044339162.1	652	69.67	6.25	90.49	-0.024

最近；分支Ⅳ仅包括小麦成员(图 2a)。

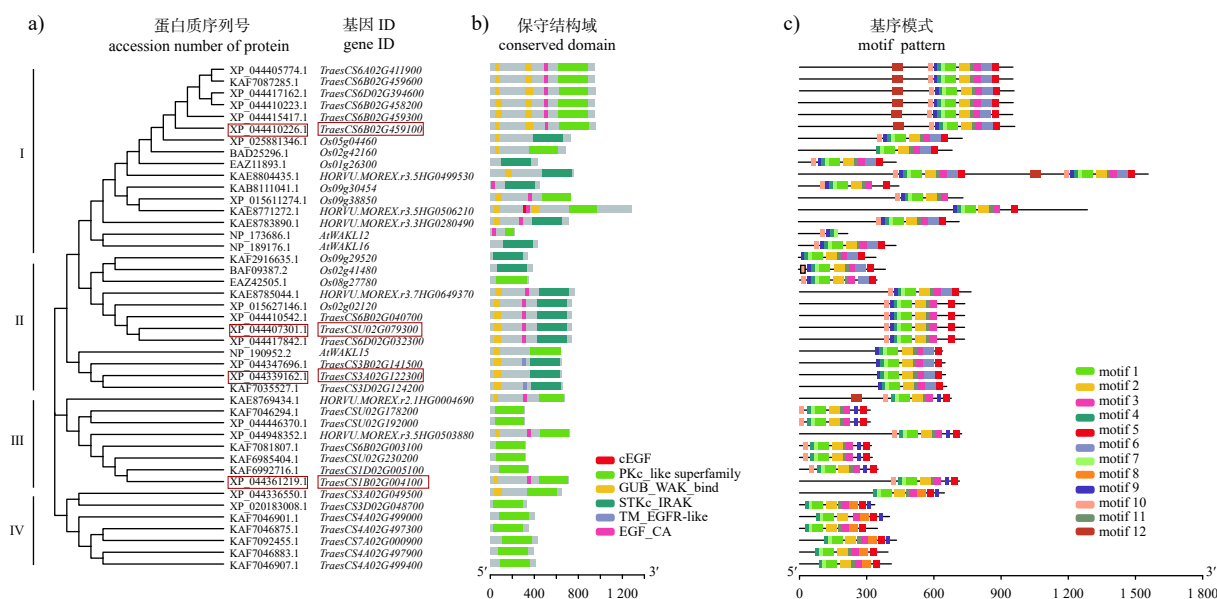
蛋白结构域预测结果显示：小麦、大麦、拟南芥和水稻 WAKs/WAKLs 蛋白序列均包括激酶部位(图 2b)。在进化分支Ⅰ中，小麦 WAKs/WAKLs 蛋白都包括 2 个 GUB_WAK_bind 结构域，1 个 EGF 和 1 个 STK，除水稻 *Os01g26300* 和拟南芥 *AtWAKL16* 编码的蛋白质不具有胞外结构域外，其他成员均具有胞外结构域。在进化分支Ⅱ中，大部分水稻成员不具备胞外结构域，而其他成员均具备；部分小麦成员还具有跨膜 TM_FGFR-like 结构域。在进化分支Ⅲ中，除小麦 *TraesCS1B02G004100* 和大麦 *HORVU.MOREX.r2.1-HG0004690*、*HORVU.MOREX.r3.5HG0503880* 编码的蛋白质具有完整的胞内和胞外结构域外，其他成员均不具备。在进化分支Ⅳ中，只有 *TraesCS3A02G049500* 编码的蛋白质具有胞外和胞内结构域。说明胞内 STK 为所有成员共有，预测 WAKs/WAKLs 家族基因发挥功能与激酶部位有较大关联。

基序预测结果显示：小麦、大麦、拟南芥和水稻的 WAKs/WAKLs 蛋白序列共包括 12 种基序(图 2c)。进化分支Ⅰ包括 11 种基序，*TraesCS6B02G459100* 与大麦 *HORVU.MOREX.r3.3HG04-*

99530 编码的蛋白质基序相似；进化分支Ⅱ包括 10 种基序，*TraesCSU02G079300* 与水稻 *Os02g0-2120*、大麦 *HORVU.MOREX.r3.7HG0649430* 编码的蛋白基序高度相似，*TraesCS3A02G122300* 与拟南芥 *AtWAKL15* 编码的蛋白基序高度相似；进化分支Ⅲ包括 10 种基序，*TraesCS1B02G004100* 与大麦 *HORVU.MOREX.r3.5HG0503880* 编码的蛋白基序高度相似；进化分支Ⅳ包括 9 种基序，均是来自小麦 WAKs/WAKLs 家族的成员，且编码的蛋白基序基本相似。此外，基序 1、2、3、4、5、7、8、11 为所有成员共有，均包括 STK，预测胞内激酶部位保守性较高，是决定蛋白质功能的关键基序；基序 9、10、12 包括胞外 EGF 和半乳糖醛酸结合结构域 (galacturonic acid binding domain, GUB)，说明胞外结构域多样，但具有一定的保守性。

2.4 WAKs/WAKLs 蛋白激酶部位的同源性比对

为了进一步研究激酶部位的保守性，预测其发挥功能的部位，对涉及的成员进行激酶部位蛋白序列同源性比对分析。该部位通常有 2 个与激酶发挥功能有关的重要区域，包括蛋白激酶 ATP 结合位点、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性位点和酪氨酸蛋白激酶活性位点(图 3)，分析结果显示：



注：红色框为从转录组中筛选的 4 个 WAKs/WAKLs 基因；下同。

Note: In the red box are four WAKs/WAKLs genes screened from the transcriptome; the same as below.

图 2 小麦与拟南芥、水稻、大麦 WAK/WAKLs 基因中保守蛋白质的系统进化关系 (a)、蛋白结构域 (b) 和基序结构 (c)

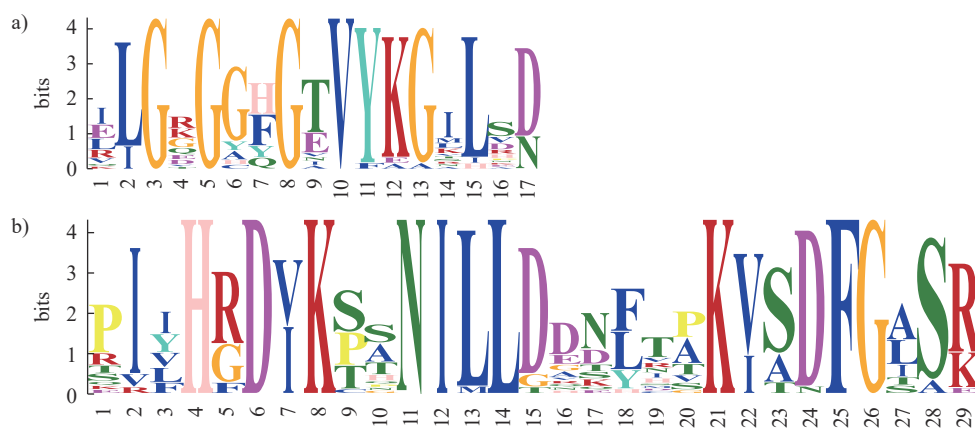
Fig. 2 Phylogenetic relationship (a), protein domain(b) and motifs structure (c) based on the amino acid sequences of WAKs/WAKLs from *Triticum aestivum* and *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, and *Hordeum vulgare*

胞内结构域同源性达 73.34%, 蛋白激酶 ATP 结合位点、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性位点和酪氨酸蛋白激酶活性位点保守性强, 均符合这 2 个结合位点序列构成特征。根据蛋白激酶 ATP 结合位点中不变的天冬氨酸 (D) 附近是否存在保守精氨酸 (R), 将激酶分为 RD 型激酶和非 RD 型激酶, 由图 4 可知: *TraesCS6B02G459100* 和 *TraesCS3A-02G122300* 为 RD 型激酶, *TraesCS1B02G004100* 和 *TraesCSU02G079300* 为非 RD 型激酶。

2.5 小麦 *WAKs/WAKLs* 基因响应条锈病的表达

由图 5 可知: 4 个基因在小麦接种条锈菌亲

和互作和非亲和互作过程中差异表达。侵染 0 h, *TraesCS1B02G004100* 和 *TraesCS6B02G459100* 在小麦与条锈菌非亲和互作中被短暂诱导表达后下调, 随后在侵染早期 (24~48 h) 上调表达, 而 *TraesCS3A02G122300* 则表达相反; *TraesCSU02G-079300* 在早期表达量无显著差异。接种 48 h 后, *TraesCS1B02G004100* 和 *TraesCSU02G079300* 表达受到抑制而下调直至接种 168 h; *TraesCS6B02G459100* 表达则呈上调直至接种 120 h。综上所述, 亲和互作过程中, *TraesCS1B02G004100* 和 *TraesCS6B02G459100* 几乎不表达, *TraesCS3A0-*



注: a) 蛋白激酶 ATP 结合位点; b) 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性位点或酪氨酸蛋白激酶活性位点。

Note: a) ATP binding; b) serine/threonine protein kinase active site, or tyrosine protein kinases specific active site.

图 3 *WAKs/WAKLs* 蛋白激酶催化域中的保守结构域基序

Fig. 3 Conserved domain motifs in the catalytic domain of *WAKs/WAKLs* protein kinases

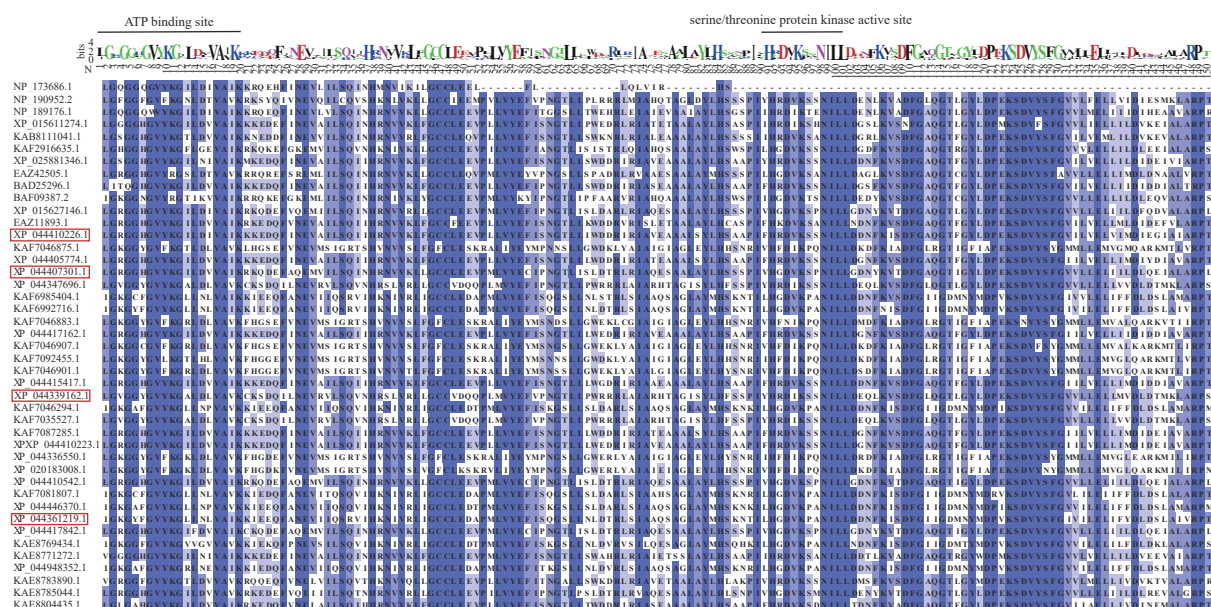


图 4 小麦与拟南芥、水稻、大麦 *WAK/WAKLs* 基因氨基酸多序列同源比对

Fig. 4 Homology alignment of amino acid sequences of *WAKs/WAKLs* genes in *T. aestivum* and *A. thaliana*, *O. sativa*, and *H. vulgare*

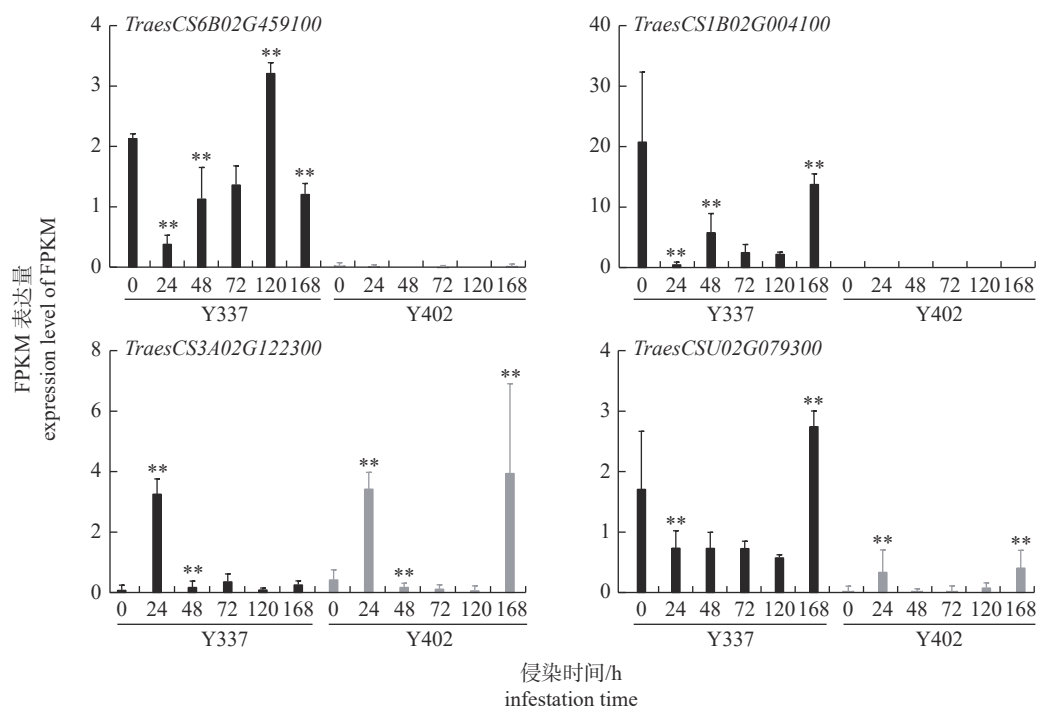
2G122300 早期表达趋势和非亲和互作一致, *TraesCSU02G079300* 在早期表达量低于非亲和互作。

由图 6 可知: 非亲和互作过程中, 在条锈菌感染小麦的 24~48 h, *TraesCS1B02G004100* 上调表达, *TraesCS6B02G459100* 显著上调表达, *TraesCS3A02G122300* 和 *TraesCSU02G079300* 表达受到抑制而下调; 在接种条锈菌 48 h 后, *TraesCS1B02G004100* 和 *TraesCS6B02G459100* 先下调后上调表达; *TraesCS6B02G459100*、*TraesCS3A02G122300* 和 *TraesCSU02G079300* 的表达量分别在接种条锈菌 120、24 和 168 h 后达到峰值。亲和互作过程中, *TraesCS1B02G004100* 几乎不表达; 转录组中几乎未表达的 *TraesCS6B02G459100*, 在接种 0~24 h 被抑制表达, 24 h 后上调表达, 168 h 表达量达到峰值, 但由于该基因转录丰度较低, 可能导致 RT-qPCR 检测结果不能有效地反映其实际表达情况; *TraesCS3A02G122300* 和 *TraesCSU02G079300* 在接种早期下调表达, 接种 120 h 后表达上调。综上所述, 4 个基因在小麦和条锈菌互作过程中利用转录组和 RT-qPCR 分析的表达模式基本一致。

3 讨论

WAKs/WAKLs 基因在植物中属于大家族, 目前从拟南芥中鉴定了 26 个 *WAKs/WAKLs* 基因, 水稻中 125 个, 大麦中 91 个, 小麦中 320 个^[19-21], 作为病原菌的模式识别受体, 它在植物信号转导过程中发挥着重要作用。本课题组从转录组中筛选的 4 个 *WAKs/WAKLs* 基因, 其结构域存在一定差异, 暗示这 4 个基因功能上存在差异; 通过 RT-qPCR 验证, 阐明 *TraesCS1B02G004100* 基因参与调控小麦对条锈病的抗性, 研究结果为揭示 *WAKs/WAKLs* 基因调控抗病性的功能和机制提供了参考。

本研究的 4 个 *WAKs/WAKLs* 基因具有典型的胞外富含半胱氨酸的 GUB_WAK_bind 和胞内丝氨酸/苏氨酸激酶结构域。从进化分支上看, 小麦 *TraesCS6B02G459100* 与水稻 *OsWAK91* 的亲缘关系最近, *OsWAK91* 正向调控水稻抵御稻瘟病菌侵染^[16]。已有研究报道: 2 个胞外结构域变异的 *OsWAK10* 基因以不同的亲和力结合果胶寡糖, 以控制水稻次生壁的合成^[22], 由此可以说



注: “**”表示与上一个时间相比, 在 0.01 水平上差异极显著; 下同。

Note: “**” indicate extremely significant differences at the 0.01 level compared to the previous time; the same as below.

图 5 4 个 *WAKs/WAKLs* 基因在抗病品种云 337 (Y337) 和感病品种云 402 (Y402) 接种 CYR32 后的转录组表达量

Fig. 5 Transcriptome expression level of four *WAKs/WAKLs* genes in resistant variety Yun337 (Y337) and susceptible variety Yun402 (Y402) post inoculation with CYR32

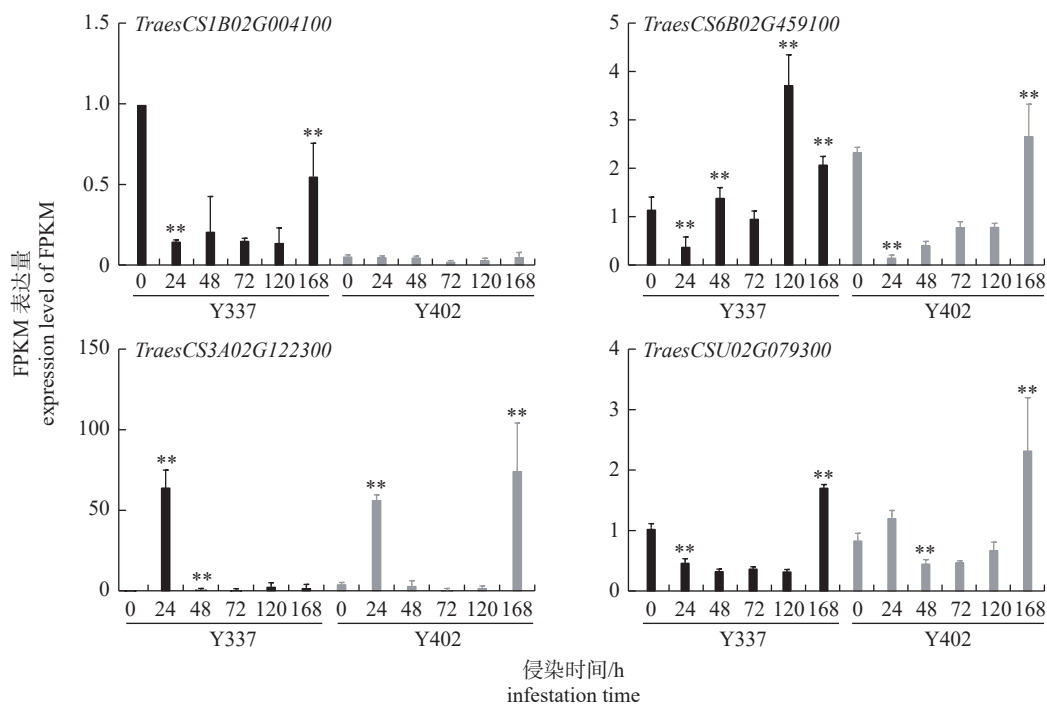


图 6 RT-qPCR 验证 4 个 *WAK/WAKLs* 基因在抗病品种云 337 (Y337) 和感病品种云 402 (Y402) 接种 CYR32 后的表达模式

Fig. 6 Expression patterns of four *WAKs/WAKLs* in resistant variety Yun337 (Y337) and susceptible variety Yun402 (Y402) post inoculation with CYR32 by RT-qPCR

明: GUB 作为首先感知到外界信号的受体, 可以与果胶结合激活 *WAKs/WAKLs* 基因, 以调节植物细胞形态。TraesCS6B02G459100 与上述 2 个水稻 *WAKs* 基因同为 RD 激酶, 由此可以推测, 该基因可能编码与调节植物生长发育、抗病相关的激酶, 相较于其他 3 个基因, 其具有的 2 个 GUB 结构域在信号转导过程中的作用机制值得探索。TraesCS3A02G122300 与未知功能的激酶聚为同一分支, 在抗感材料中都被抑制表达, 但在后期感病材料的表达量高于抗病材料, 尽管属于 RD 激酶, 但已有报道中也出现能够调控植物抗病反应的 RD 激酶, 如 *OsWAK91*、*OsWAK92*、*OsWAK94* 和 *OsWAK14* 基因是水稻对稻瘟病菌数量抗性的调节因子^[16], 因此 TraesCS3A02G122300 的具体功能机制值得进一步研究。

WAK/WAKL 家族胞内的 ATP 结合位点及丝氨酸/苏氨酸结合位点是调节植物先天免疫的重要结构^[23], 尤其是丝氨酸/苏氨酸蛋白酶活性位点中保守的天冬氨酸附近是否存在精氨酸很大程度上决定了激酶的功能。已知在先天免疫中作为 PRRs 的 15 个激酶中有 12 个是非 RD 型^[24], 表明所有非 RD 激酶可能都参与先天免疫。TraesCS1B-

02G004100 和 TraesCSU02G079300 为非 RD 型激酶。其中, TraesCS1B02G004100 在亲和互作体系中几乎不表达; 而在非亲和体系中, 该基因早期被诱导, 24 h 以后被抑制, 这与已报道的 *OsWAK112d* 基因表达模式一致, 且过表达 *OsWAK112d* 基因及其突变体分别增加了水稻的易感性和抗性, 表明其在植物感染期间是抑制基础抗性的负调控因子^[16], 故推测 TraesCS1B02G004100 可能是小麦响应条锈菌侵染的负调控基因, 并且早期可能被 PAMPs 诱导。TraesCSU02G079300 与 *OsWAK11* 处于同一进化分支, *OsWAK11* 通过 GUB 结合果胶并监测果胶甲基化的变化以解毒过量的铜, 并且可以调节细胞的伸长率以适应外界环境的变化^[25], 其转录丰度的趋势与 TraesCS1B02G004100 相似, 并且在 2 种互作体系中差异表达, 该基因可能也在防御反应中发挥作用。

本研究筛选的小麦 *WAKI* 基因 TraesCS1B02G004100 和已经在小麦中鉴定到的 *Snn1* 基因同源性最高, 达 99.86%。在腐生病原菌 (*Parastagonospora nodorum*) 和小麦互作过程中, SnTox1 作为病原菌分泌的效应蛋白与 *Snn1* 基因相互作用, 引起小麦细胞程序性死亡并赋予其对叶斑病

的易感性, *Snn1-SnTox1* 是小麦和叶斑病互作的多个重要模式之一^[26-27]。本研究发现: 在小麦与条锈菌非亲和互作过程中, *TraesCS1B02G004100* 基因响应条锈菌感染且表达受到抑制, 而在亲和互作过程中不受条锈菌诱导表达, 说明该基因极大可能参与调控小麦对条锈病的抗性。

4 结论

4 个小麦 *WAKs/WAKLs* 基因中, *TraesCS3A0-2G122300* 和 *TraesCSU02G079300* 在小麦与条锈菌亲和及非亲和互作体系中差异表达; *TraesCS6-B02G459100* 和 *TraesCS1B02G004100* 在小麦非亲和互作中特异表达。非 RD 型激酶 *TraesCS1B02-G004100* 在表达过程中受到抑制, 作为病原菌效应蛋白的受体, 其在参与调控小麦对条锈病的抗性功能值得进一步研究; 其他 3 个 *WAKs/WAKLs* 基因在植物生长发育过程中的作用也值得探索。

[参考文献]

- SHIU S H, BLEECKER A B. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling[J]. Science's STKE, 2001, 2001(113): re22. DOI: 10.1126/stke.2001.113.re22.
- VAN DER GEER P, HUNTER T, LINDBERG R A. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways[J]. Annual Review of Cell Biology, 1994, 10(1): 251. DOI: 10.1146/annurev.cb.10.110194.001343.
- LIU C, HAN L H, CHU H L. Research advances in molecular mechanism between plant and pathogen interaction[J]. Microbiology China, 2018, 45(10): 2271. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.170969.
- JONES J D G, DANGL J L. The plant immune system[J]. Nature, 2006, 444(7117): 323. DOI: 10.1038/nature05286.
- SANABRIA N M, HUANG J C, DUBERY I A. Self/non-self-perception in plants in innate immunity and defense[J]. Self/Nonself, 2010, 1(1): 40. DOI: 10.4161/self.1.1.10442.
- 张素巧, 孙颖, 郭毅, 等. 细胞壁连接的类受体激酶(WAK): 植物细胞壁与细胞质联系的重要蛋白[J]. 科学通报, 2006, 51(1): 1. DOI: 10.1360/csb2006-51-1-1.
- 师莹莹, 李大勇, 张慧娟, 等. 植物细胞壁介导的抗病性及其分子机制[J]. 植物生理学报, 2011, 47(7): 661. DOI: 10.13592/j.cnki.ppj.2011.07.009.
- BRUTUS A, SICILIA F, MACONE A, et al. A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(20): 9452. DOI: 10.1073/pnas.1000675107.
- 左为亮. 玉米抗丝黑穗病主效QTL的克隆与抗病机理研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
- WANG P, ZHOU L, JAMIESON P A, et al. The cotton wall-associated kinase GhWAK7A mediates responses to fungal wilt pathogens by complexing with the chitin sensory receptors[J]. The Plant Cell, 2020, 32(12): 3978. DOI: 10.1105/tpc.19.00950.
- 邓俊杰. 山新杨*PdPapWAK*基因抗逆功能研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021.
- 马占鸿. 中国小麦条锈病研究与防控[J]. 植物保护学报, 2018, 45(1): 1. DOI: 10.13802/j.cnki.zwbhxb.2018.2018900.
- 何锋, 王长春, 王锋青, 等. 植物抗病基因(R)与病原物无毒基因(Avr)相互作用机制的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(9): 1037.
- QI H J, ZHU X L, GUO F, L, et al. The wall-associated receptor-like kinase TaWAK7D is required for defense responses to *Rhizoctonia cerealis* in wheat[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(11): 5629. DOI: 10.3390/ijms22115629.
- SAINTENAC C, LEE W S, CAMBON F, et al. Wheat receptor-kinase-like protein Stb6 controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*[J]. Nature Genetics, 2018, 50(3): 368. DOI: 10.1038/s41588-018-0051-x.
- DELTEIL A, GOBBATO E, CAYROL B, et al. Several wall-associated kinases participate positively and negatively in basal defense against rice blast fungus[J]. BMC Plant Biology, 2016, 16(1): 17. DOI: 10.1186/s12870-016-0711-x.
- ROSLI H G, ZHENG Y, POMBO M A, et al. Transcriptomics-based screen for genes induced by flagellin and repressed by pathogen effectors identifies a cell wall-associated kinase involved in plant immunity[J]. Genome Biology, 2013, 14(12): R139. DOI: 10.1186/gb-2013-14-12-r139.
- 梁子英, 刘芳. 实时荧光定量PCR技术及其应用研究进展[J]. 现代农业科技, 2020(6): 1. DOI: 10.3969/j.issn.1007-5739.2020.06.001.
- ZHANG S B, CHEN Z J, LI L, et al. Evolutionary expansion, gene structure, and expression of the rice wall-associated kinase gene family[J]. Plant Physiology, 2005, 139(3): 1107. DOI: 10.1104/pp.105.069005.
- TRIPATHI R K, AGUIRRE J A, SINGH J. Genome-wide analysis of wall associated kinase (WAK) gene family in barley[J]. Genomics, 2021, 113(1): 523. DOI: 10.1016/j.ygeno.2020.09.045.
- XIA X B, ZHANG X, ZHANG Y C, et al. Characterization of the WAK gene family reveals genes for FHB resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(13): 7157. DOI: 10.3390/ijms23137157.
- CAI W G, HONG J, LIU Z Y, et al. A receptor-like kinase controls the amplitude of secondary cell wall synthesis in rice[J]. Current Biology, 2023, 33(3): 498. DOI: 10.1016/j.cub.2022.12.035.
- LIU J, LI W J, WU G, et al. An update on evolutionary, structural, and functional studies of receptor-like kinases in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2024, 15(1): 1305599. DOI: 10.3389/fpls.2024.1305599.
- DARDICK C, RONALD P. Plant and animal pathogen recognition receptors signal through non-RD kinases[J]. PLoS Pathogens, 2006, 2(1): e2. DOI: 10.1371/journal.ppat.0020002.
- YUE Z L, LIU N, DENG Z P, et al. The receptor kinase OsWAK11 monitors cell wall pectin changes to fine-tune brassinosteroid signaling and regulate cell elongation in rice[J]. Current Biology, 2022, 32(11): 2454. DOI: 10.1016/j.cub.2022.04.028.
- LI D, WALKER E, FRANCKI M. Genes associated with foliar resistance to *Septoria nodorum* blotch of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(11): 5580. DOI: 10.3390/ijms22115580.
- SHI G J, ZHANG Z C, FRIESEN T L, et al. The hijacking of a receptor kinase-driven pathway by a wheat fungal pathogen leads to disease[J]. Science Advances, 2016, 2(10): e1600822. DOI: 10.1126/sciadv.1600822.

责任编辑: 何承刚