

# 大麦黄花叶病相关基因 *WRKY55* 的克隆及功能研究

周之楠<sup>1</sup>, 阚金红<sup>2</sup>, 栾海业<sup>3</sup>, 沈会权<sup>3</sup>, 杨平<sup>2</sup>, 冯宗云<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>四川农业大学农学院, 成都 611130; <sup>2</sup>中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; <sup>3</sup>江苏沿海地区农业科学研究所, 盐城 224002)

**摘要:** 大麦黄花叶病是我国长江中下游地区大麦种植区域的主要病毒病害, 由大麦黄花叶病毒 (BaYMV, *Barley yellow mosaic virus*) 及大麦和性花叶病毒 (BaMMV, *Barley mild mosaic virus*) 引起, 自然条件下病毒寄生于禾谷多黏菌中, 通过感染大麦根部导致病害发生。本研究通过分析 RNA-seq 数据, 获得感染 BaMMV 后上调表达的基因 *HORVUIHr1G069640* (*WRKY55*)。荧光定量 PCR 分析发现 *WRKY55* 在感病品种中的表达水平极显著高于抗病材料, 说明 *WRKY55* 参与到大麦感染黄花叶病的过程。*WRKY55* 全长 870 bp, 在 415~594 位核苷酸之间含有 WRKY 保守结构域, 系统进化分析显示该基因位于独立的进化分枝。组织表达分析发现该基因主要在根部和幼嫩组织中表达, 而其他成熟部位表达较少甚至没有。农杆菌介导的烟草亚细胞定位实验发现 *WRKY55* 位于整个细胞。酵母转录因子活性分析实验未检测到转录激活活性, 酵母双杂交实验未检测到 *WRKY55* 与感病基因编码蛋白 eIF4E 和 PDIL5-1 存在物理相互作用。这些结果显示 *WRKY55* 参与到大麦黄花叶病感染。

**关键词:** 大麦; 大麦黄花叶病; BaYMV/BaMMV; WRKY 转录因子; 抗病机制

## Characterization of a Candidate Transcription Factor *WRKY55* that Associated with the Infection of Barley Yellow Mosaic Virus Disease

ZHOU Zhi-nan<sup>1</sup>, KAN Jin-hong<sup>2</sup>, LUAN Hai-ye<sup>3</sup>, SHEN Hui-quan<sup>3</sup>, YANG Ping<sup>2</sup>, FENG Zong-yun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> *Colleague of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130*; <sup>2</sup> *Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081*; <sup>3</sup> *Institute of Agricultural Sciences of Coastal Area Jiangsu, Yancheng 224002*)

**Abstract:** Barley yellow mosaic virus disease, caused by *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) and *Barley mild mosaic virus* (BaMMV), is a major viral disease in barley planting regions of Europe and East Asia countries. In the field, this disease is transmitted by the soil-borne fungus *Polymyxa graminis* via inoculating the roots. Here, by unlocking the transcriptome datasets, we identified a differentially expressed gene *HORVUIHr1G069640* (referred *WRKY55*) that was significantly up-regulated after infection with BaMMV. Consistently, by analyzing its expression in a group of naturally-inoculated genotypes, a significantly higher expression of *WRKY55* was observed in susceptible relative to resistant genotypes. This gene contains an 870 bp of the coding sequence with a conserved WRKY domain between nucleotides 415'-594'. Phylogenetic analysis revealed an independent branch of this gene, differed to the sequence homologous genes. This gene was highly expressed in roots and young tissues, but rarely expressed in other tissues. By *Agrobacterium*-mediated transformation into *Nicotiana benthamiana* Domin, the *WRKY55*-GFP fusion protein was found in the whole

收稿日期: 2018-05-29 修回日期: 2018-06-20 网络出版日期: 2018-09-14

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180912.0952.001.html>

第一作者研究方向为大麦生物化学与分子生物, E-mail: 1270588432@qq.com; 阚金红为共同第一作者, E-mail: kanjinhong@caas.cn

通信作者: 杨平, 研究方向为大麦基因资源, E-mail: yangping@caas.cn

冯宗云, 研究方向为作物遗传育种, E-mail: zvfeng49@126.com

**基金项目:** 中国农业科学院基本科研业务费 (S2018YC01, S2018PY03); 中国农业科学院科技创新工程; 国家现代农业产业技术体系 (大麦青稞体系) 建设专项经费 (CARS-05); 江苏省农业科技自主创新资金 (CX(17)3056)

**Foundation project:** Fundamental Research Funds for Central Non-Profit of Institute of Crop Sciences of CAAS (S2018YC01, S2018PY04), Agricultural Science and Technology Innovation Program of CAAS, Modern Agricultural Industry Technology System of Barley, China (CARS-05), Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund (CX(17)3056)

cell. In yeast, no trans-activation activity of WRKY55 was detected and no physical interaction between WRKY55 and either susceptibility factors eIF4E or PDIL5-1 were observed. This work identified a BaMMV-infected up-regulated gene *WRKY55*, which possibly was involved in infection of BaYMV/BaMMV.

**Key words:** barley; barley yellow mosaic virus disease; BaYMV/BaMMV; WRKY transcription factor; disease resistance mechanism

大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 是世界种植面积与总产量排名第四的禾谷类作物, 在中国拥有悠久的栽种历史, 主要作为牲畜饲料、食品加工原料以及啤酒酿造原料等<sup>[1]</sup>。大麦黄花叶病是我国长江中下游大麦种植区域的主要病毒病害, 由大麦黄花叶病毒 (BaYMV, *Barley yellow mosaic virus*) 和大麦和性花叶病毒 (BaMMV, *Barley mild mosaic virus*) 感染引起, 自然条件下病毒寄生于土壤中的禾谷多黏菌 (*Polymyxa graminis*) 孢子中<sup>[2]</sup>, 可以潜伏长达十年之久<sup>[3]</sup>, 因而成为一种长期持久的病害。针对不同发病情况, 感病的冬大麦品种产量损失可高达 50%<sup>[4-6]</sup>。BaYMV 和 BaMMV 属于马铃薯 Y 病毒科大麦黄花叶病毒属, 其基因组序列差异显著但是结构组成相似, 都含有 2 条 RNA, 编码 10 个不同的功能蛋白, 其中 RNA1 编码位于 C 末端的外壳蛋白 CP, 细胞质包涵体蛋白 C1, 基因组连接蛋白 VPg 和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 N1b, RNA2 含有编码半胱氨酸蛋白酶活性相关的 P1 和未知功能的 P2 蛋白<sup>[7]</sup>。目前, 已报道大麦黄花叶病抗性遗传位点 18 个, 其中隐性抗性位点 15 个。通过图位克隆分析发现, 抗性基因座 *rym4/5* 和 *rym1/11* 分别由感病基因真核生物转录起始因子 *eIF4E* 和蛋白二硫键异构酶 *PDIL5-1* 编码, 前者由氨基酸突变引起, 后者由其编码的蛋白功能丢失导致<sup>[8-11]</sup>。由于病毒随土壤中的禾谷多黏菌传播具有持久性, 一旦植株感染病毒, 传统化学方法防治失效, 因而选育抗病大麦品种是防控该病的最有效途径。

WRKY 转录因子家族是一个超级家族, 在拟南芥和水稻中分别鉴定出 74 个和 109 个 WRKY 转录因子<sup>[12-13]</sup>。该家族成员通常含 4 个共同的功能区域, 包括 DNA 结合区、转录调控区、寡聚化位点以及用于识别 WRKY 转录因子的核定位信号, 不同家族成员可能含有其中部分结构域, 某些结构域可能缺失<sup>[14]</sup>。位于 WRKY 转录因子 DNA 结合区的锌指蛋白通常含有高度保守的 WRKY 结构域, 这个保守结构域由约 60 个氨基酸残基组成, 靠近氨基 N 末端的 7 个保守氨基酸残基翻译为 WRKYGQK, 即高度保守的 WRKY 结构域<sup>[15]</sup>, 保

守区域一个氨基酸的改变都可能导致 WRKY 转录因子和 DNA 结合活性的降低甚至消失。WRKY 转录因子与基因启动子的结合具有序列专一性, 特异性识别 W-box, 即 (T)(T)TGAC(C/T) 片段<sup>[16]</sup>, TGAC 是 W-box 高度保守的核心序列。通常情况下, WRKY 转录因子定位于植物细胞核中。

WRKY 转录因子参与植物的防卫反应和信号转导等途径<sup>[17]</sup>, 通过特异性识别并结合启动子区域的 W-box<sup>[18-19]</sup>, 对基因转录进行正向或负向调控, 从而翻译应激或抗病蛋白起始抗病反应, 抗病过程包括基础防卫反应、激发子反应和系统获得性抗性等。WRKY 转录因子可直接调控抗病基因的表达, 如拟南芥基因 *RRS1-R* 启动子中的 W-box 元件与 WRKY 转录因子结合增强导致基因上调表达, 完成对细菌性枯萎病、青枯病的抗病反应<sup>[20]</sup>。WRKY 可以通过调控抗病基因编码蛋白与其他蛋白质互作完成抗病反应, 如在番茄中 6 个 WRKY 转录因子可以与其他基因启动子中的 W-box 结合, 通过转录调控进而影响抗病蛋白与 MAPK 等蛋白相互作用, 对番茄黄叶卷曲病进行正负调控<sup>[21]</sup>。WRKY 转录因子可以受抗病相关植物激素如水杨酸、茉莉酸、乙烯等诱导上调表达, 从而完成抗病信号转导引起抗病性反应<sup>[22]</sup>。WRKY 转录因子也可以调控植物激素从而达到抗病的目的, 如拟南芥中的 WRKY33 可与调控脱落酸 ABA 生成的基因 *NCED3* 和 *NCED5* 结合, 抑制脱落酸的生成, 从而完成抑制真菌灰葡萄孢菌感染<sup>[23]</sup>。

本研究通过分析大麦黄花叶病感染后的转录组数据, 获得一个病毒侵染后上调表达的 WRKY 基因 *WRKY55* (*HORVUIHr1G069640*), 通过生物信息学和分子生物学等相结合的研究方法, 探究 *WRKY55* 参与大麦黄花叶病感染中的作用机理, 为创制大麦黄花叶病抗性种质资源和培育抗病品种提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

植物材料包括六棱大麦栽培品种 Morex,

38 份大麦黄花叶病抗感种质(表 1), 本生烟草 (*Nicotiana benthamiana* Domin); 大肠杆菌感受态 DH5 $\alpha$  和 DB3.1; 农杆菌感受态 GV3101; 酵母感受态 Y187 和 Y2H-Gold。

表 1 用于定量 PCR 的大麦材料及其大麦黄花叶病的抗病性分析结果

Table 1 The information and disease resistance of genotypes used in Real-time PCR assay

名称 Accession name	地理来源 Origin	田间病情 级数 Disease score	抗感分类 Clarification of phenotype
BR1	中国江苏如皋	1	抗
BR2	法国	1	抗
BR3	苏联	1	抗
BR4	朝鲜	1	抗
BR5	中国江苏赣榆	1	抗
BR6	中国浙江义乌	1	抗
BR7	不详	1	抗
BR8	中国浙江萧山	1	抗
BR9	日本	1	抗
BR10	中国浙江义乌	1	抗
BR11	德国	1	抗
BR12	中国江苏如东	1	抗
BR13	德国	1	抗
BR14	不详	1	抗
BR15	中国河南虞城	1	抗
BR16	中国青海海晏	1	抗
BR17	朝鲜	1	抗
BR18	朝鲜	1	抗
BR19	中国江苏南通	1	抗
BS1	法国	9	感
BS2	中国青海循化	9	感
BS3	中国安徽滁县	9	感
BS4	捷克斯洛伐克	9	感
BS5	墨西哥	5	感
BS6	中国西藏曲松	5	感
BS7	中国西藏康马	5	感
BS8	瑞典	5	感
BS9	中国江苏江都	3	感
BS10	日本	9	感
BS11	中国山西忻县	5	感
BS12	中国江西德兴	3	感
BS13	中国山西大同	5	感
BS14	中国内蒙古 化德	7	感
BS15	中国西藏隆子	7	感
BS16	中国西藏琼结	5	感
BS17	中国西藏昌都	3	感
BS18	中国河南淇县	3	感
BS19	加拿大	7	感

## 1.2 基因 *WRKY55* 的生物信息分析

从大麦专业数据库 BARLEX (<https://apex.ipk-gatersleben.de/apex/f?p=284:10>) 中下载基因 *HORVUIHr1G069640* (*WRKY55*) 的编码框序列, 通过 NCBI 数据库序列比对工具 (blastn) 搜索其他物种中该基因的同源性基因, 下载相似度高的同源基因序列。利用 MEGA 7 软件进行系统进化分析, 采用邻接法构建系统进化树, Bootstrap 值为 1000。从 BARLEX 数据库下载 *HORVUIHr1G069640* 基因在不同组织部分的表达数据。采用 NCBI 在线预测工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), 分析 *WRKY55* 的功能结构域。利用 DTU Bioinformatics 工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), 预测 *WRKY55* 编码蛋白的亚细胞定位信息。

## 1.3 总 RNA 提取、反转录和 PCR 扩增

针对大麦栽培品种 Morex 的 2~4 叶苗期和抽穗期的整棵植株, 包括根茎叶及幼穗, 分别取样混匀, 液氮冷冻磨成粉末, 采用 Trizol 法 (英潍捷基(上海)贸易有限公司) 提取总 RNA, 用于基因克隆。针对大田自然接种之后用于分析基因表达的大麦品种, 对新叶和老叶混合取样, 每个基因型取样 1 次, 不做生物学重复, 其总 RNA 提取方法与之前相同。DNaseI (北京全式金生物技术有限公司) 处理去除残余的 DNA, 采用 1  $\mu$ g 的总 RNA, 通过 SuperScriptIII 逆转录酶 [英潍捷基(上海)贸易有限公司] 反转录得到 cDNA。将获得的 cDNA 稀释 25 倍后作为模板, 采用高保真聚合酶 Phusion (Thermo-fisher) PCR 扩增, PCR 扩增引物见表 2。PCR 扩增条件: 预变性 98  $^{\circ}$ C 3 min; 变性 98  $^{\circ}$ C 30 s, 退火 58  $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72  $^{\circ}$ C 1 min 30 s; 循环 36 次; 最后延伸 72  $^{\circ}$ C 5 min; 冷却 4  $^{\circ}$ C 30 s。

## 1.4 大麦黄花叶病抗性鉴定方法

本研究主要采用大田病土自然接种, 结合田间病情分级和实验室病毒检测相结合的抗性鉴定方法。根据《大麦种质资源描述规范和数据标准》<sup>[24]</sup> 将田间病情分成 5 级法 (1: 高抗, 叶片生长正常, 无褪绿斑, 无黄化; 3: 抗, 叶片有褪绿斑, 不黄化; 5: 中抗, 叶片轻度黄化; 7: 感, 叶片长度 1/2 黄化, 植株矮化; 9: 高感, 叶片严重黄化, 植株矮缩或死亡)。大田病情连续调查 3 次, 每次间隔 1 周。

表2 本研究使用的引物

Table 2 The primers used in this study

引物名称 Primer name	正向引物(5'-3') Forward primer	反向引物(5'-3') Reverse primer	产物长度(bp) Length of fragment
<i>WRKY55-C</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TTCATGTTCAATTGTCACCCTGTTCA	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGG TCGCTACCGCCTCCTGTGTGA	312
<i>WRKY55</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TTCATGGCGATGCGGACCAAGTC	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGG TCGCTACCGCCTCCTGTGTGATGA	870
pDONR207	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	—
<i>HvUBC</i>	AAGCAGCCAGAATGTACAGCGAGAAC	GGTACAGACCAGCAAAGCCAGAAATG	152
<i>WRKY55-qRT</i>	CATGCAGTGCTTTGTTCCACG	GAGCAATGGCAGTGAGGAGTAAG	212

— : 测序引物 — : sequencing primer

### 1.5 基因表达分析

在江苏盐城大麦黄花叶病的病田中自然接种病毒,该病土感染大麦黄花叶病毒和大麦和性花叶病毒,获得抗大麦黄花叶病和感染大麦黄花叶病田间栽培材料各19份(表1)。大田发病条件下,对病叶取样提取RNA后反转录得到cDNA。将获得的cDNA稀释20倍后作为模板,以*HvUBC*作为内参基因(表2),采用iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD) 荧光染料进行Real-Time PCR定量分析。其中每份材料作为一个生物学重复,每个材料做反应时重复3次。Real-Time PCR扩增条件:预变性,95℃ 3 min;变性95℃ 15 s,退火58℃ 15 s,延伸72℃ 20 s;循环40次;熔解曲线,65~95℃,0.5℃/0.05 s。

### 1.6 克隆和实验载体构建

PCR扩增产物采用1%琼脂糖凝胶电泳,切胶回收PCR产物,通过Gateway克隆将目标片段连接到中间载体pDNOR207,转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,过夜培养挑取阳性克隆,通过菌落PCR和Sanger测序验证,序列正确的质粒通过Gateway方法连接到表达载体ppy2-GW(含GFP报告基因)、pGADT7-GW和pGBKT7-GW上,用于检测基因的亚细胞定位和酵母双杂交实验。

### 1.7 烟草转化和亚细胞定位

将获得的ppy2-*WRKY55-C*和ppy2-*WRKY55*分别转化到农杆菌感受态GV3101中。将ppy2-*WRKY55-C*、ppy2-*WRKY55*、ppy2-EV(不含基因插入)、P19和pCAMBIA2300-RFP-DLT(定位于细胞核的阳性对照载体,由中国农业科学院作物科学研究所董红宁研究员提供)<sup>[25]</sup>的单克隆菌落于平板上活化。挑取单菌落,LB液体培养基(+*Spe*)30℃摇

菌12 h,按照1:100比例接种到10 mL LB扩大液体培养基(+*Spe*)中,摇菌17 h,将菌液吸光值调到OD<sub>600</sub>≈1。离心收集菌体去上清,加入含10 mmol/L MES-KOH(pH5.7)、10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>和150  $\mu$ mol/L乙酰丁香酮的重悬液洗菌体2次后重悬,将重悬菌液等体积混合后避光静置3 h,注射4~5周龄烟草。注射48 h后,利用激光扫描共聚焦显微镜(Zeiss LSM800)观察基因的亚细胞定位。

### 1.8 转录激活活性检测和酵母双杂交自激活检测

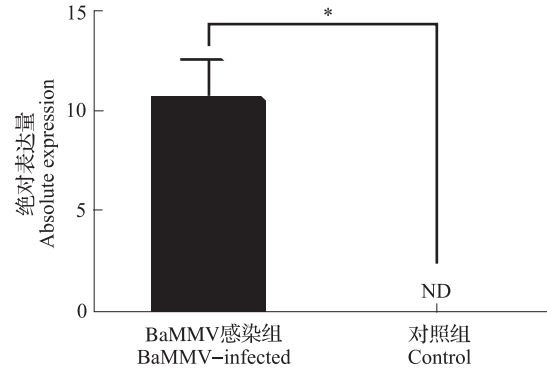
将pGBKT7-*WRKY55-C*和pGBKT7-*WRKY55*通过PEG-LiAc法分别转化到酵母感受态Y2H-Gold中。挑取筛选培养基SD/-Trp平板上培养pGBKT7-*WRKY55-C*和pGBKT7-*WRKY55*的单克隆菌落,液体培养至OD<sub>600</sub>约为0.1,稀释成1、10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>和10<sup>-4</sup>,在筛选培养基SD/-Trp-His和SD/-Ade-Trp-His的平板上检测转录因子活性。将pGADT7-*WRKY55-C*(或者pGADT7-*WRKY55*)与pGBKT7和pGADT7与pGBKT7-*WRKY55-C*(或者pGBKT7-*WRKY55*)共转化至Y2H-Gold,挑取双缺培养基SD/-Leu-Trp上的白色单克隆菌落,液体培养至OD<sub>600</sub>约为0.1,稀释成1、10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>和10<sup>-4</sup>,在培养基SD/-Leu-Trp、SD/-Leu-Trp-His和SD/-Ade-Leu-Trp-His上检测*WRKY55*的自激活。挑取未有自激活活性的*WRKY55-C*和*WRKY55*,液体培养至OD<sub>600</sub>约为0.1,与eIF4E和PDIL5-1进行酵母双杂交检测是否在酵母系统中有物理互作。

## 2 结果与分析

### 2.1 *WRKY55*的生物信息学分析

前期结果中,通过对BaMMV感染(实验组)和H<sub>2</sub>O(对照组)处理后4周的大麦品种Igr1取样

提取总 RNA, 通过转录组测序 (RNA-seq) 分析发现, BaMMV 感染后导致基因 *HORVUIHr1G069640* 表达显著上调 (图 1)。该基因编码框全长 870 bp, 大麦基因组注释信息显示该基因为 *WRKY55*, NCBI 保守结构域分析发现该基因含有 1 个保守的 WRKY 结构域, 位于 415~594 bp, 亚细胞定位预测显示该基因定位于细胞核中。通过 NCBI 在线序列比对, 选取同源性较高的 11 个来自不同植物的 *WRKY* 基因进行多序列比对, 通过 MEGA7 构建进化树。结果显示, 尽管与其他物种中 *WRKY* 蛋白存在序列相似性, 但是大麦 *WRKY55* 位于独立的进化分枝 (图 2)。组织和时空表达分析显示, 大麦 *WRKY55* 主要在苗期的根部和地上部分、分蘖、新生穗、灌浆前期的籽粒, 以及籽粒灌浆期植株根部分表达, 而其他成熟部位表达较少甚至没有 (图 3)。



统计方法为 *t* 检验 (\*:  $P < 0.05$ ), ND, 未检测到表达。

误差棒代表标准误差

Statistics analysis method used is *t*-test (\*:  $P < 0.05$ ), ND = not detected; Error bar = the standard error

图 1 *WRKY55* 受 BaMMV 诱导表达

Fig.1 The induction of *WRKY55* by BaMMV infection

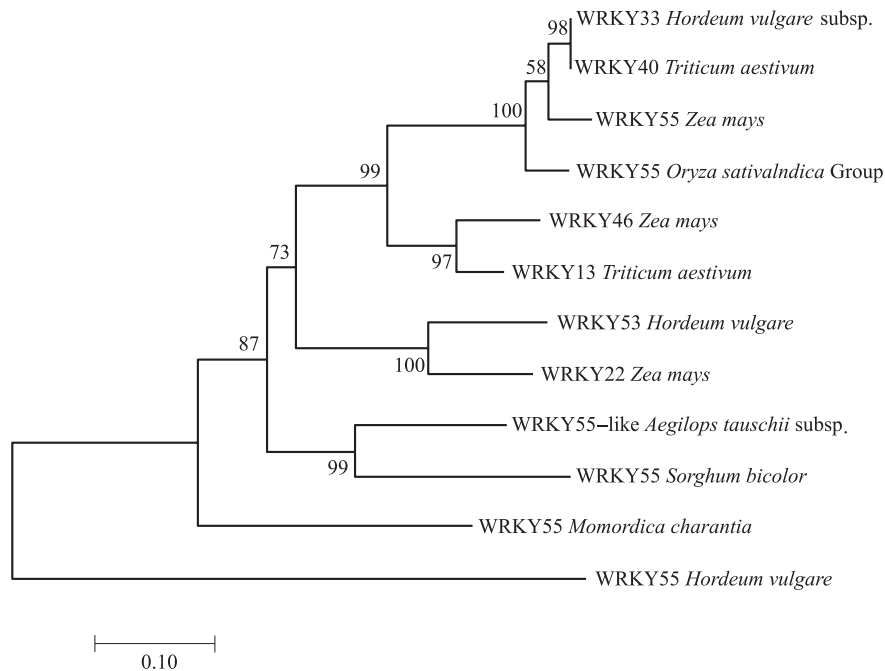


图 2 *WRKY55* 的系统进化树分析

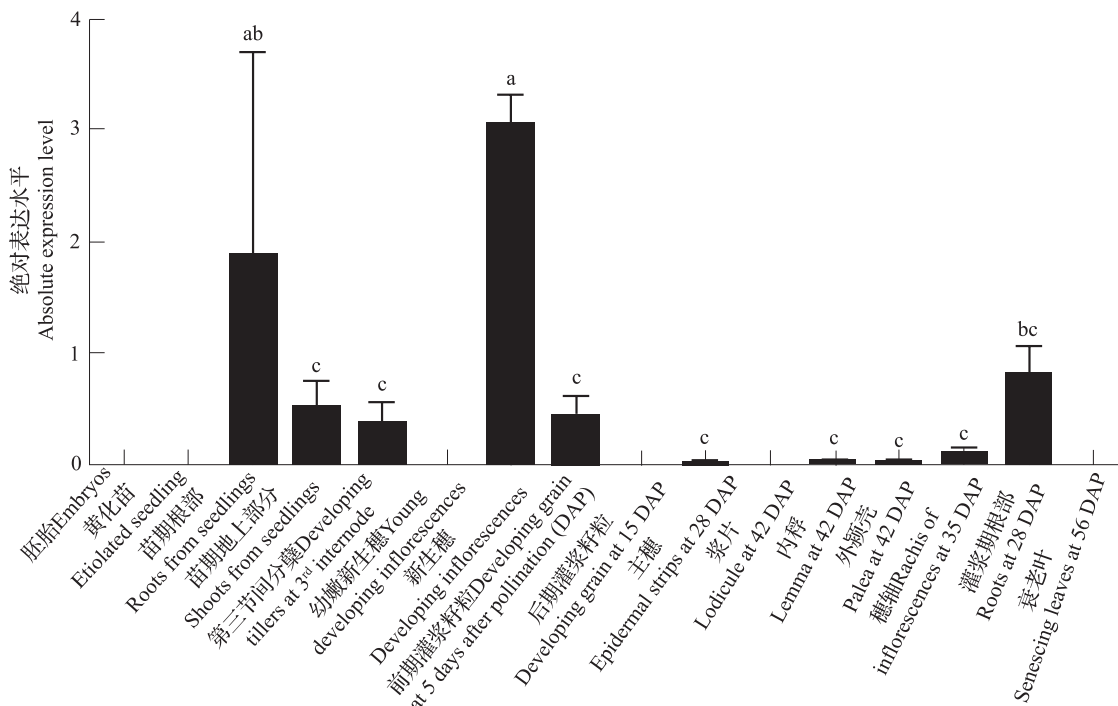
Fig.2 Phylogenetic tree of *WRKY55*

## 2.2 *WRKY55* 在黄花叶病抗 / 感材料中的表达分析

为检测 *WRKY55* 在大麦黄花叶病感染过程中是否发挥作用, 通过 Real-time PCR 对 *WRKY55* 在黄花叶病抗病和感病材料中的表达进行定量分析。首先结合大田病情分级及实验室病毒检测相结合的抗性鉴定方法, 结果如表 1 所示。各选取抗、感材料 19 份, 利用大麦基因 *HvUBC* 作为内参基因。如图 4 所示, *WRKY55* 在感病材料中的相对表达量极显著高于抗病材料 ( $P < 0.0001$ ), 说明 *WRKY55* 参与到大麦黄花叶病感染过程中。

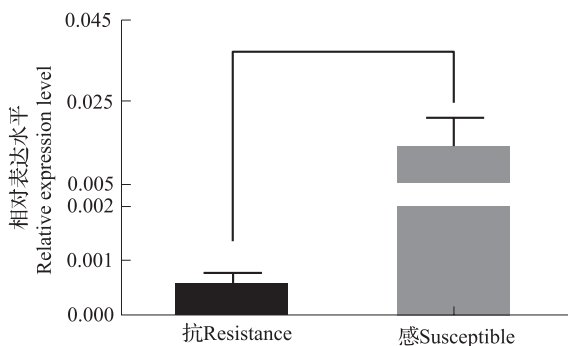
## 2.3 *WRKY55* 的亚细胞定位

为检测 WRKY 结构域在 *WRKY55* 中的功能, 以 Morex 不同生长时期和不同部位的 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板, 利用高保真的 DNA 聚合酶克隆获得 2 个转录本 (*WRKY55* 和 *WRKY55-C*), 均包含完整的编码框, *WRKY55* 全长核苷酸编码序列为 870 bp, *WRKY55-C* 编码序列为 312 bp, 后者不含 WRKY 结构域和 N 末端序列 (图 5)。为检测 *WRKY55* 两个转录本的亚细胞定位, 利用农杆菌转化烟草瞬时表达系统 (图 6), 检测目的基因的



统计分析方法为单因素的方差分析,误差棒代表标准误差  
Statistical analysis method is one-way ANOVA. Error bar = the standard error

图 3 WRKY55 的组织表达分析  
Fig.3 The tissue expression of WRKY55



统计分析方法为 *t* 检验 (\*\*\*,  $P < 0.0001$ )。误差棒代表标准误差  
Statistical analysis method used is *t*-test (\*\*\*,  $P < 0.0001$ ). Error bar = the standard error

图 4 WRKY55 相对表达量  
Fig.4 Relative expression of WRKY55

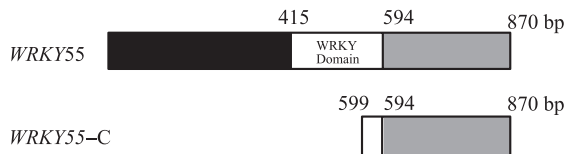


图 5 WRKY55-C 和 WRKY55 基因结构分析  
Fig.5 The organization of WRKY55-C and WRKY55 coding sequences

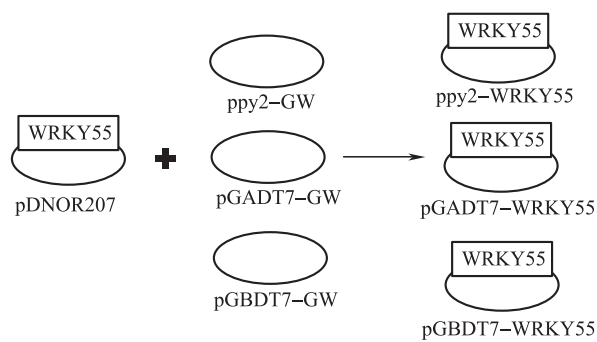


图 6 通路克隆载体构建示意图  
Fig.6 The schematic pipeline of vector construction using gateway approach

亚细胞定位(图 7A)。在激光共聚焦显微镜下,以 WRKY55 融合表达的 GFP 蛋白 (*Ubi::WRKY55-GFP*) 的绿色荧光信号布满整个细胞,与只含 GFP 蛋白的空载体 (*Ubi::GFP*) 具有相似的亚细胞定位(图 7B)。DLT 作为转录因子,定位在细胞核中,以 DLT 融合的 RFP (*35S::DLT-RFP*) 在红色荧光通道下可看到明显的细胞核内信号。在双通道荧光信号叠加后,可以看到 WRKY55 在细胞核内具有明黄色荧光信号,进一步证明 WRKY55 在细胞核内也有定位,即 WRKY55 定位于整个细胞。为检

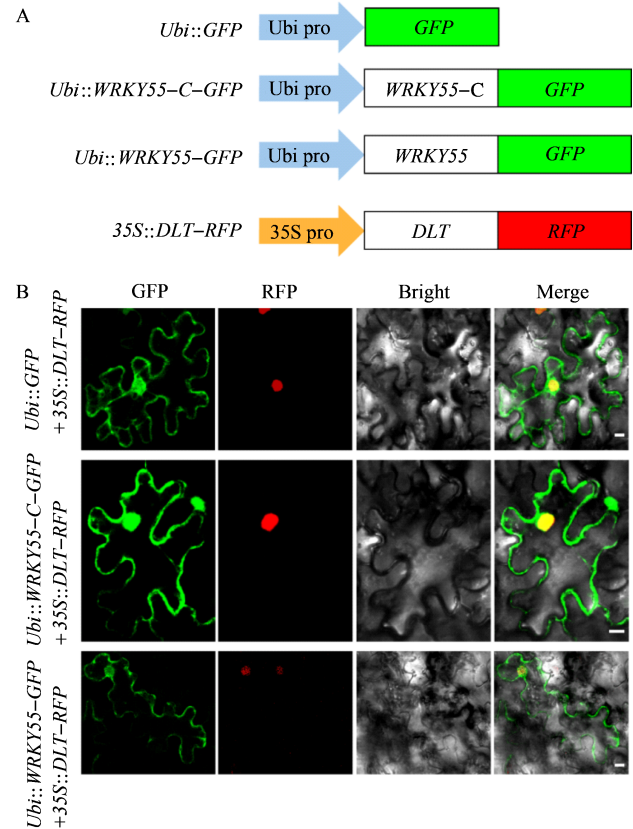
测 WRKY 结构域是否影响 WRKY55 的亚定位, 本研究检测了 WRKY55-C 的亚细胞定位。结果显示 WRKY55-C (*Ubi::WRKY55-C-GFP*) 在整个细胞中都有绿色荧光信号, 其定位与全长的 WRKY55 相同 (图 7B), 说明 WRKY 并不影响 WRKY55 蛋白的定位。上述结果显示, WRKY55 与其他 WRKY 家族蛋白定位于细胞核不同, 该蛋白定位在整个细胞中, 预示 WRKY55 可能存在新的功能。

### 2.4 酵母系统检验 WRKY55 转录因子活性

为验证 WRKY55 是否作为转录因子发挥作用, 利用酵母系统检测其是否具有转录激活活性。将 pGBKT7-*WRKY55-C* (BD-*WRKY55-C*) 和 pGBKT7-*WRKY55* (BD-*WRKY55*) 分别转化 Y2HGGold 酵母菌株, 随后在 SD/-Trp-His 和 SD/-Trp-His-Ade 上同时检测其生长情况。如图 8 所示, 阳性对照 BD-Nac7、AD-T+BD-53 在二缺培养基和三缺培养基上可以正常生长, 但是 BD-*WRKY55-C* 和 BD-*WRKY55* 均不能生长, 说明在酵母中 WRKY55 和 WRKY55-C 不具有转录激活活性。

为检测 WRKY55 是否具有结合活性和自激活活性, 在 Y2HGGold 中分别双转 AD-*WRKY55*+BD、AD+BD-*WRKY55*、AD-*WRKY55-C*+BD 和 AD+BD-*WRKY55-C*。如图 9 所示, 双转 AD-*WRKY55*+BD 和 AD-*WRKY55-C*+BD 在三缺培养基上可以生长, 四缺培养基上不能生长, 说明其具有微弱的转录因子结合活性和自激活活性; AD+BD-*WRKY55* 和 AD+BD-*WRKY55-C* 不能在筛选培养基生长, 说明 WRKY55 的两个转录本均不具有自激活活

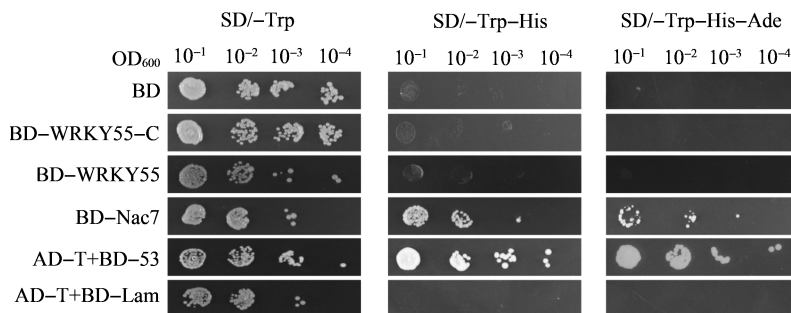
性, 将来可以用来检测与候选蛋白互作和酵母文库筛选。



(A) 载体构建示意图。(B) 亚细胞定位实验结果。*Ubi::GFP*: 阴性对照; *35S::DLT-RFP*: 细胞核定位对照。比例尺为 10 μm  
(A) Schematic diagram of plasmid constructs. (B) Outcome of subcellular localization. *Ubi::GFP*: the negative control, *35S::DLT-RFP*: the positive control with the nuclear localization. Scale bar = 10 μm

图 7 WRKY55-C 和 WRKY55 的亚细胞定位

Fig.7 Subcellular localization of the WRKY55-C and WRKY55

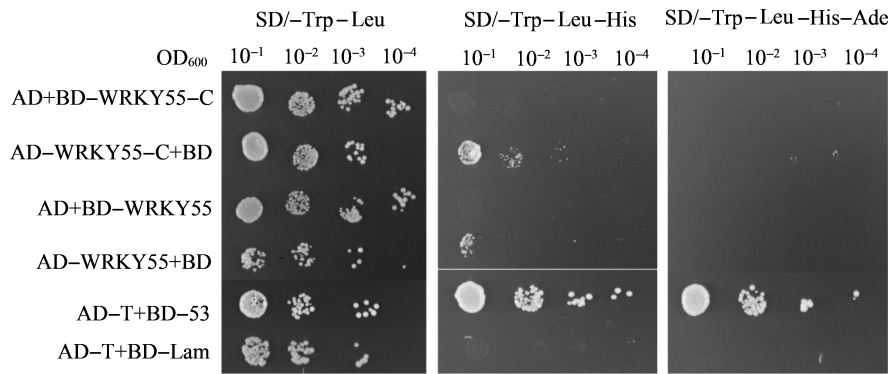


BD-Nac7 和 AD-T+BD-53 为阳性对照, 能在氨基酸缺陷型培养基上生长; AD-T+BD-Lam 为阴性对照, 筛选培养基上不能生长。Trp: 色氨酸; His: 组氨酸; Ade: 腺嘌呤, 下同

BD-Nac7 and AD-T+BD-53 are the positive controls, while AD-T+BD-Lam is the negative control. Trp: tryptophan; His: histidine, Ade: adenine, the same as below

图 8 WRKY55-C 和 WRKY55 的转录激活活性检测

Fig.8 Tests for transactivation activity of the WRKY55-C and WRKY55



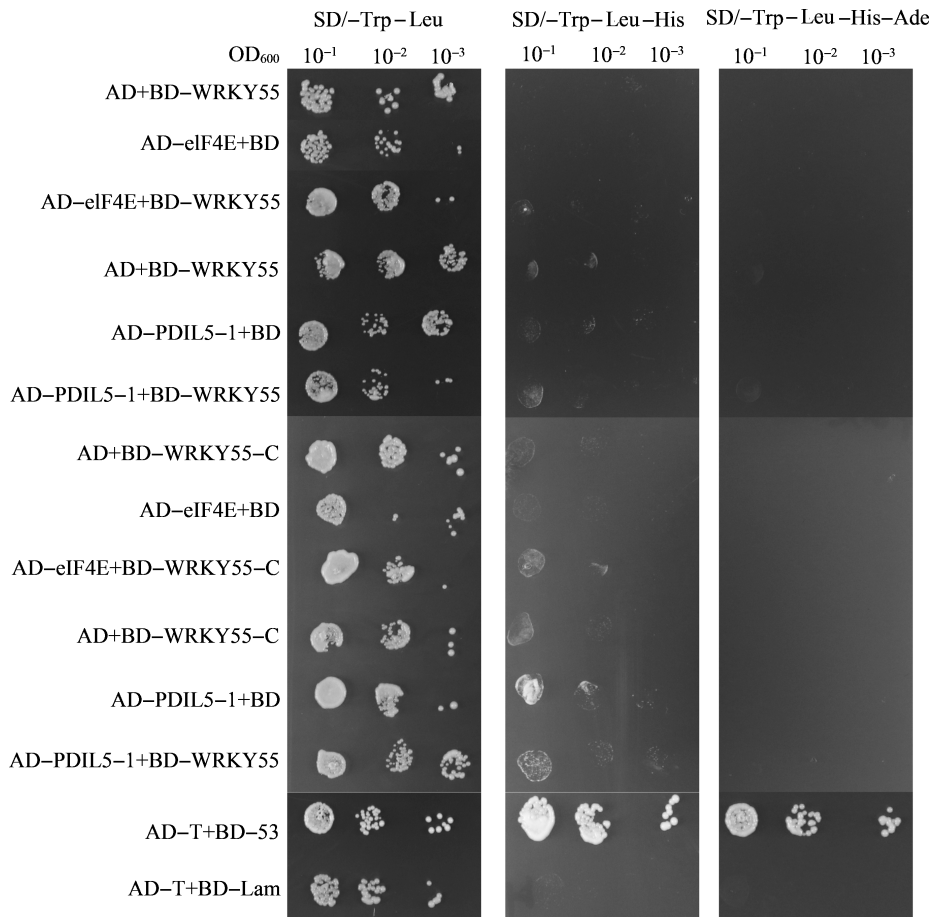
AD-T+BD-53 和 AD-T+BD-Lam 分别为阳性和阴性对照。Leu: 亮氨酸, 下同  
 AD-T+BD-53 and AD-T+BD-Lam are the positive and negative controls, respectively. Leu: leucine, the same as below

图9 WRKY55-C 和 WRKY55 的自激活检测

Fig.9 The auto-activation activity of the WRKY55-C and WRKY55

此外,选取没有自激活活性的 BD-WRKY55-C 和 BD-WRKY55 与 AD-eIF4E、AD-PDIL5-1 配对进行酵母双杂交实验,结果显示筛选培养基上转

化体均不能生长(图 10),说明在酵母中 WRKY55 与感病基因 eIF4E、PDIL5-1 没有物理互作关系。



AD-T+BD-53 和 AD-T+BD-Lam 分别为阳性和阴性对照

AD-T+BD-53 and AD-T+BD-Lam are the positive and negative controls, respectively

图10 WRKY55-C 和 WRKY55 与 eIF4E、PDIL5-1 的酵母双杂交检测互作关系

Fig.10 Yeast-two hybrid test for physical interaction of WRKY55-C and WRKY55 with eIF4E and PDIL5-1



### 3 讨论

WRKY 转录因子参与植物抗病过程可以通过多种方式, 一是作为转录因子直接与抗病基因启动子区的 W-box 结合, 从而激活或抑制抗病相关基因的表达; 二是通过与抗病途径中的 MAPK 蛋白或其他蛋白互作, 直接调控植物的抗病过程; 三是通过翻译后修饰改变 WRKY 的活性, 从而影响抗病相关基因的表达<sup>[26-27]</sup>。本研究通过分析已有的转录组数据, 通过同源克隆的研究手段<sup>[28]</sup>, 获得了感染 BaMMV 后上调表达的基因 *WRKY55* (*HORVUIHr1G069640*)。通过分析大田采集的大麦抗/感材料的基因表达, *WRKY55* 在感染黄花叶病的材料中表达量明显高于抗病材料。组织表达分析也发现, *WRKY55* 主要在根部和幼嫩组织中表达, 其表达部位与大麦黄花叶病的发病部位基本吻合。由此, 我们认为 *WRKY55* 可能作为一个感病基因, 参与并辅助 BaMMV 的成功感染。

通过烟草瞬时转化介导的亚细胞定位分析发现, *WRKY55* 分布于整个细胞中, 与生物信息学预测定位于细胞核中不同。系统进化分析显示该基因位于独立的进化分枝, 与其他物种中的 *WRKY55* 存在显著的序列分化。在酵母系统中, *WRKY55* 具有微弱的绑定活性, 没有检测到转录因子激活活性。这些结果暗示, *WRKY55* 的作用方式可能与传统的转录因子有所不同, 其参与病毒感染的方式也许不是调控感病基因表达。但是, 通过酵母双杂交实验, 并未检测到 *WRKY55* 与大麦感病因子 EIF4E 和 PDIL5-1 的互作, 暗示 *WRKY55* 不是通过与这两个感病因子直接互作, 进而参与病毒感染过程。因此, 我们认为 *WRKY55* 尽管参与病毒感染过程, 具体的作用机制有待进一步探究。

#### 参考文献

- [1] 卢良恕. 中国大麦学. 北京: 中国农业出版社, 1995: 1-11  
Lu L S. Barley researches in China. Beijing: China Agriculture Press, 1995: 1-11
- [2] 陈剑平. 大麦黄花叶病及其真菌介体禾谷多粘菌的研究进展. 中国病毒学, 1992, 7(1): 1-10  
Chen J P. Research advance on barley yellow mosaic viruses and their fungal vector *Polymyxa graminis* L. *Virologica Sinica*, 1992, 7(1): 1-10
- [3] Kashiwazaki S, Minobe Y, Hibino H. Nucleotide sequence of barley yellow mosaic virus RNA2. *Journal of General Virology*, 1991, 72(4): 995-999
- [4] Adams M J, Hill S A. Soil-borne mosaic viruses of cereals: The UK situation. London: Home Grown Cereals Authority, 1992: 1-8
- [5] Huth W. Management of yellow mosaic-inducing viruses on barley by selection of resistant cultivars. *EPPO Bulletin*, 1989, 19(3): 547-553
- [6] Plumb R T, Lennon E A, Gutteridge R A. The effects of infection by barley yellow mosaic-virus on the yield and components of yield of barley. *Plant Pathology*, 1986, 35(3): 314-318
- [7] You Y, Shirako Y. Bymovirus reverse genetics: requirements for RNA2-encoded proteins in systemic infection. *Molecular Plant Pathology*, 2010, 11(3): 383-394
- [8] Yang P, Lupken T, Habekuss A, Hensel G, Steuernagel B, Kilian B, Ariyadasa R, Himmelbach A, Kumlehn J, Scholz U, Ordon F, Stein N. PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE LIKE 5-1 is a susceptibility factor to plant viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(6): 2104-2109
- [9] Stein N, Perovic D, Kumlehn J, Pellio B, Stracke S, Streng S, Ordon F, Graner A. The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive Bymovirus resistance in *Hordeum vulgare*. *Plant Journal*, 2005, 42(6): 912-922
- [10] Yang P, Habekuss A, Ordon F, Stein N. Analysis of bymovirus resistance genes on proximal barley chromosome 4HL provides the basis for precision breeding for BaMMV/BaYMV resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 2014, 127(7): 1625-1634
- [11] Yang P, Habekuss A, Hofinger B J, Kanyuka K, Kilian B, Graner A, Ordon F, Stein N. Sequence diversification in recessive alleles of two host factor genes suggests adaptive selection for bymovirus resistance in cultivated barley from East Asia. *Theoretical and Applied Genetics*, 2017, 130(2): 331-344
- [12] Kalde M, Barth M, Somssich I E, Lippok B. Members of the Arabidopsis WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signaling pathways. *Molecular Plant and Microbe Interact*, 2003, 16(4): 295-305
- [13] Wu K L, Guo Z J, Wang H H, Li J. The WRKY family of transcription factors in rice and Arabidopsis and their origins. *DNA Research*, 2005, 12(1): 9-26
- [14] Seo S, Sano H, Ohashi Y. Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell*, 1999, 11(2): 289-298
- [15] Maeo K, Hayash I S, Kojima-Suzuki H, Morikami A, Nakamura K. Role of conserved residues of the WRKY domain in the DNA-binding of tobacco WRKY family proteins. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2001, 65(11): 2428-2436
- [16] Eulgem T, Rushton P J, Schmelzer E, Hahlbrock K, Somssich I E. Early nuclear events in plant defense: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO Journal*, 1999, 18(17): 4689-4699
- [17] Naoumkina M, He X, Dixon R. Elicitor induced transcription factors form metabolic reprogramming of secondary metabolism in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology*, 2008, 8(1): 132
- [18] Turck F, Zhou A, Somssich I E. Stimulus-dependent, promoter-specific binding of transcription factor WRKY1 to its native promoter and the defense related gene PcPRI-1 in Parsley. *Plant Cell*, 2004, 16(10): 2573-2585