

# 小麦 F-box/Kelch 类基因 *TaFKOR23* 的抗逆 相关表达模式及分子互作蛋白鉴定

魏春茹<sup>1</sup>, 孟钰玉<sup>1</sup>, 范润侨<sup>1</sup>, 赵梦伊<sup>1</sup>, 于秀梅<sup>1,2,3</sup>, 赵伟全<sup>3</sup>, 康振生<sup>2</sup>, 刘大群<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>河北农业大学生命科学学院/河北省植物生理与分子病理学重点实验室, 保定 071001; <sup>2</sup>西北农林科技大学植物保护学院/旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西杨凌 712100; <sup>3</sup>河北省农作物病虫害生物防治技术创新中心, 保定 071001)

**摘要:** 为了解 F-box 成员在小麦中响应生物和非生物逆境的表达情况及作用机制, 本研究自小麦抗叶锈病近等基因系 *TcLr15* 中克隆了 F-box 基因 *TaFKOR23*, 该基因编码一个由 421 个氨基酸残基组成的蛋白, N 端具有 F-box 结构域, 中间带有 2 个明显的 Kelch 结构域, 属于 F-box/Kelch 类型基因。系统进化分析表明, *TaFKOR23* 与粗山羊草 (*Aegilops tauschii* Coss.) 和二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv.) 中的 F-box/Kelch-repeat protein OR23 同源性均较高。利用 qRT-PCR 对接种亲和及非亲和叶锈菌、激素处理、非生物逆境胁迫后 *TcLr15* 植株中该基因的表达模式进行分析。研究表明, *TaFKOR23* 基因表达受叶锈菌感染而略升高, 但在亲和与非亲和组合间的表达量无明显差异; 受脱落酸 (ABA)、水杨酸 (SA) 和茉莉酸甲酯 (MeJA) 3 种激素处理后, 该基因均呈先升高后降低的表达趋势, 且表达量于处理后 12 h 达到最高, MeJA 对该基因的诱导表达程度略高于 SA 和 ABA; 盐胁迫处理后, 除了 12 h 外, *TaFKOR23* 整体呈现上升的表达趋势, 最高表达峰出现在处理后 48 h; *TaFKOR23* 受聚乙二醇 (PEG) 处理的影响较小; 该基因在旗叶中的表达量远高于其他部位。利用酵母双杂交文库筛选并验证与该基因编码蛋白互作的上游靶蛋白。经文库筛选得到 11 类可能与 *TaFKOR23* 互作的靶蛋白, 进一步回转变验证及  $\beta$ -半乳糖苷酶检测结果表明 *TaFKOR23* 与小麦 S-期激酶相关蛋白 (*TaSkp1*)、SEC1 家族运输蛋白 *SLY1* (*TaSLY1*) 和几丁质酶 2 (*TaChitinase 2*) 均存在相互作用。研究结果为深入解析小麦中 Kelch 类 F-box 基因的功能及代谢网络奠定了基础, 并拓宽了对植物中 Kelch 类 F-box 基因的功能认识。

**关键词:** 小麦; F-box/Kelch; *TaFKOR23*; 表达模式; 蛋白互作

## Stress-related Expression Profile of F-box/Kelch Gene *TaFKOR23* in Wheat and Molecular Characterization of the Interacting Target Protein

WEI Chun-ru<sup>1</sup>, MENG Yu-yu<sup>1</sup>, FAN Run-qiao<sup>1</sup>, ZHAO Meng-yi<sup>1</sup>, YU Xiu-mei<sup>1,2,3</sup>,  
ZHAO Wei-quan<sup>3</sup>, KANG Zhen-sheng<sup>2</sup>, LIU Da-qun<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Sciences, Hebei Agricultural University/Hebei Key Laboratory of Plant Physiology and Molecular Pathology, Baoding 071001; <sup>2</sup>College of Plant Protection, Northwest A&F University/State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Shaanxi Yangling 712100; <sup>3</sup>Technological Innovation Center for Biological Control of Crop Diseases and Insect Pests of Hebei Province, Baoding 071001)

**Abstract:** To understand the expression profile and molecular mechanism of F-box members in response to biotic/abiotic stresses in wheat, *TcLr15*-a near isogenic line against leaf rust pathogen, was used as the material

收稿日期: 2019-06-26 修回日期: 2019-10-15 网络出版日期: 2019-12-17

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190626002>

第一作者研究方向为植物抗病机理研究, E-mail: 992669202@qq.com

通信作者: 于秀梅, 研究方向为植物抗病机理研究。E-mail: nongdayxm@163.com

**基金项目:** 旱区作物逆境生物学国家重点实验室开放课题基金 (CSBAKF2018008); 河北省高等学校科学技术研究项目 (ZD2019086); 国家自然科学基金 (31301649); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20121302120010)

**Foundation projects:** Open Research Fund of State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas (CSBAKF2018008), Higher Education Science and Technology Research Project of Hebei Province (ZD2019086), National Natural Science Foundation (31301649), Doctoral Program of Higher Education (Specialized Research Fund) (20121302120010)

to obtain a wheat F-box gene *TaFKOR23*. The complete coding region encodes a polypeptide of 421 aa with 1 F-box domain at N-terminal and 2 typical Kelch domains in the middle, which means that the wheat *TaFKOR23* belongs to F-box/Kelch subfamily. Phylogenetic tree showed that wheat *TaFKOR23* had extremely high homology with F-box/Kelch-repeat protein OR23 from *Aegilops tauschii* Coss. and *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. Expression profiles of the gene in *TcLr15* plants after treatment with leaf rust pathogens, 3 hormones and abiotic stresses were analyzed by qRT-PCR in the present study. *TaFKOR23* was slightly up-regulated by infection of leaf rust pathogen, but no significant difference was observed for *TaFKOR23* transcripts accumulation between compatible and incompatible combinations. *TaFKOR23* showed a trend of rise first, then fall, and the expression peak reached at 12 h after treatment with 3 hormones, and MeJA caused slightly expression of *TaFKOR23* than that of SA and ABA. *TaFKOR23* transcript increased gradually after treatment with NaCl at all time course except 12 h, and the maximum expression occurred at 48 h. PEG had less effect on *TaFKOR23*. *TaFKOR23* prominently expressed in flag leaves than in other parts of wheat. Target proteins interacting with *TaFKOR23* were screened and identified by yeast two-hybrid, 11 kinds of target proteins were obtained by library screening, and further results showed that *TaFKOR23* can interact with *TaSkp1*, *TaSLY 1* and *TaChitinase 2*. The research results laid a solid foundation for further understanding the function and metabolic network of F-box/Kelch genes in wheat, and broadened the functional knowledge of Kelch repeat-containing F-box genes in plant.

**Key words:** wheat; F-box/Kelch; *TaFKOR23*; expression pattern; protein interaction

SCF 复合体是真核生物泛素化降解途径中组成 E3 酶的一大类,由 Skp1、Cullin (Cdc53)、Rbx1/Roc1/Hrt1 和 F-box 蛋白共同组成,通过更换结合底物的 F-box 蛋白,实现对不同底物的特异性降解<sup>[1]</sup>。F-box 蛋白的 N 端含有约 50 个氨基酸组成的 F-box 基序,是与 SCF 复合体中 Skp1 或 Skp1 类似蛋白的结合区域<sup>[2-3]</sup>,其 C 端往往存在一些与蛋白相互作用密切相关的二级结构,负责识别待降解底物。根据 C 端结构域可对 F-box 蛋白进行分类,如 FBU (含有未知结构域)、FBL (富含 LRR 重复结构)、FBK (含有 Kelch 结构域)等<sup>[4]</sup>。F-box 蛋白在真核生物中广泛存在。目前,已从酵母、线虫、果蝇及动植物中鉴定了大量的 F-box 成员。据报道,裂殖酵母中发现了 18 个 F-box 蛋白<sup>[5]</sup>,果蝇中 33 个 F-box 基因<sup>[6]</sup>,人中 38 个 F-box 蛋白<sup>[3]</sup>;植物中也鉴定出了很多 F-box 基因,如谷子中 525 个<sup>[7]</sup>,水稻中 687 个<sup>[4]</sup>,鹰嘴豆中 285 个<sup>[8]</sup>,拟南芥中约 700 个<sup>[9]</sup>。可见,植物中 F-box 家族成员的数量远远多于动物,是植物中最大的蛋白质家族之一。

近年来,F-box 蛋白在植物抵御生物/非生物逆境胁迫中的作用已引起广泛的关注<sup>[10]</sup>。*DOR* (drought resistance) 编码 F-box 蛋白,在拟南芥中通过与 ASK14 和 CUL1 特异性相互作用,从而负向调节植物的耐旱性<sup>[11-12]</sup>。Remans 等<sup>[13]</sup> 研究显示,F-box 蛋白 AT5G15710 参与了拟南芥对重金属 Cu<sup>2+</sup> 或 Cd<sup>2+</sup> 的胁迫响应过程。F-box 蛋

白 MAX2 (FBL 类型) 不仅在植物生长发育和对植物激素——独脚金内酯的吸收过程中发挥重要作用,其突变体还能够增强拟南芥对丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae* van Hall) 和胡萝卜软腐果胶杆菌 (*Pectobacterium carotovorum* (Jones, ) Waldee) 等细菌的敏感性<sup>[14]</sup>。*F-box-Nictaba* 的表达在拟南芥中受热胁迫、*Pseudomonas syringae* van Hall 和水杨酸的诱导,通过水杨酸途径介导植物抗病性反应<sup>[15]</sup>。F-box 蛋白 CPR30 (FBA 类型) 和 SON1 (FBU 类型) 分别在拟南芥防御 *Pseudomonas syringae* van Hall 和 *Peronospora parasitica* (Pers.) Constant 的过程中发挥负调控作用<sup>[16-17]</sup>。F-box 基因 *PvFBS1* 在菜豆叶片受伤害、渗透胁迫及各种激素,如 MeJA、SA 等处理后表达量呈累积趋势<sup>[18]</sup>。目前,对于 F-box 家族在植物响应病原体侵染中的功能研究主要集中在模式植物拟南芥中,在小麦这一重要粮食作物中的研究报道较少。

本项目的研究对象属于 Kelch 类 F-box 蛋白 (FBK 类型)。Kelch 类型的 F-box 蛋白 AT2g44130 在巨大细胞中的上调表达增强了拟南芥对线虫的感病性<sup>[19]</sup>。Imaizumi 等<sup>[20-21]</sup> 的结果认为 Kelch 类 F-box 蛋白 FKF1 参与了拟南芥光形态建成和开花时间的控制过程。目前仅见少量关于 Kelch 类 F-box 蛋白功能的报道,该类型蛋白在植物中的功能尚有待深入探究。

由 *Puccinia triticina* Erikss. 引致的小麦叶锈病是世界小麦生产上最重要的病害之一。严重发生时可造成小麦 5%~15% 甚至更高的产量损失<sup>[22]</sup>。*TcLr15* 是以 Thatcher 为遗传背景的小麦抗叶锈病近等基因系, *Lr15* 基因存在于小麦染色体 2DS 上, 且为苗期抗性基因, 该基因与成株抗性基因共同存在时小麦的抗锈性明显提高, 因此将该基因与 *Lr34* 类的成株抗锈基因累积在同一品种中将大大增加品种的抗锈性<sup>[23]</sup>。目前针对小麦叶锈病的研究虽取得了一定的进展, 但小麦与叶锈菌互作的具体分子机制仍不明确。为探明 F-box 家族与小麦叶锈病发生的关系, 本实验室前期已对小麦中 F-box 家族基因开展了系统的研究, 在全基因组水平鉴定了小麦中的 F-box 蛋白, 并对其进行分类、亚细胞定位、亲缘关系、染色体定位及表达谱等分析。上述研究结合 RT-PCR 获得一个 F-box/Kelch 类基因 *TaFKOR23*。本研究以小麦 *TcLr15* 为材料, 利用 qRT-PCR 明确了 *TaFKOR23* 表达与叶锈菌侵染、激素处理和非生物逆境胁迫的关系, 通过酵母双杂交技术筛选验证了与其互作的候选靶蛋白。研究结果为深入解析小麦中 Kelch 类 F-box 基因的功能及互作网络奠定了基础。

## 1 材料与方法

本研究以小麦抗叶锈病近等基因系 *TcLr15* 为材料。小麦材料、叶锈菌生理小种 05-5-137 ③和 05-19-43 ②由河北农业大学农作物病虫害生物防治技术创新中心提供。*TcLr15* 与 05-5-137 ③组成亲和组合, *TcLr15* 与 05-19-43 ②组成非亲和组合。*TcLr15* 小麦抗叶锈病性酵母 cDNA 文库为实验室前期构建。

### 1.1 *TaFKOR23* 基因编码区全长序列获得及生物信息学特性分析

以普通小麦 D 基因组供体种粗山羊草 (*Aegilops tauschii* Coss) 中的 F-box/Kelch-repeat protein OR23 (LOC109739403) 序列为模板设计引物(表 1), 以 *TcLr15* 的 cDNA 为模板, 通过 RT-PCR 方法获得 *TaFKOR23* 基因编码区全长。PCR 反应体系: 10 × Taq Buffer 2.5 μL, 正向引物 (10 μmol/L) 0.5 μL, 反向引物 (10 μmol/L) 0.5 μL, cDNA 模板 (860 ng/μL) 1 μL, Taq DNA Polymerase (1.25 U/μL) 0.5 μL, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL。扩增程序为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 56.4 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 72 °C 延伸

10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。预期扩增片段经凝胶回收试剂盒纯化后与 pGEM T-easy 载体 (Promega) 连接。连接产物转化 *E.coli* DH 5α 感受态细胞, 挑取白色单克隆进行质粒提取和酶切检测, 然后选取阳性克隆进行序列测定。测序委托北京中科希林生物科技有限责任公司进行。

所获基因序列利用 DNASTar 设计引物及比对序列, 利用 BLAST 进行序列查找及比对, 利用 ORF Finder 预测基因的完整编码区, 利用 SMART 进行蛋白结构域预测, 利用 Signal P-4.1 prediction 预测蛋白的信号肽结构, 利用 MEGA 6 进行系统发育树的构建。

### 1.2 *TaFKOR23* 基因在 *TcLr15* 不同组织部位的表达模式

为了解 *TaFKOR23* 基因在不同组织部位表达的特异性, 于一叶一心期剪取小麦 *TcLr15* 幼叶、幼茎、幼根, 抽穗期剪取旗叶、雌蕊及雄蕊。各样品经总 RNA 提取及反转录后合成 cDNA 第 1 链, 以此为模板运用 SYBR Green I 染料法在 iQ5 实时荧光定量 PCR 仪上进行 qRT-PCR。每个样品设置 3 次生物学重复。qRT-PCR 反应体系: TransStart Tip Green qPCR Super Mix 5 μL, 正向引物 (10 μmol/L) 0.2 μL, 反向引物 (10 μmol/L) 0.2 μL, cDNA 模板 (800 ng/μL) 1 μL, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 10 μL。扩增程序为: 94 °C 预变性 30 s, 94 °C 变性 5 s, 59.4 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 10 s, 40 个循环, 65 °C 延伸 5 s。实时定量引物见表 1。以小麦 *GAPDH* (EU022331.1) 基因为内参。数据分析采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法, 差异显著性分析结果 *P* < 0.05 即为显著。

### 1.3 *TaFKOR23* 基因在叶锈菌侵染的 *TcLr15* 叶片中的表达模式

温室鉴定结果表明, *TcLr15* 对叶锈菌株 05-19-43 ②具有抗性, 侵染型为“; 级”, 但对于叶锈菌株 05-5-137 ③则较敏感, 侵染型为“4 级”。为探讨 *TaFKOR23* 基因在抗病和感病不同状态下的表达模式, 用 *TcLr15* 分别接种叶锈菌株 05-5-137 ③和 05-19-43 ②形成亲和及非亲和型组合<sup>[24]</sup>。*TcLr15* 在 16 h 光照 / 8 h 黑暗条件下生长至一叶一心期, 用毛笔蘸取叶锈菌株 05-5-137 ③和 05-19-43 ②的新鲜夏孢子涂抹于小麦第 1 片叶的正面。于接种后 0、6、12、24、48、96 h 剪取接种小麦叶片。以对应时间点无菌水处理的 *TcLr15* 叶片为对照。具体操作及数据分析同 1.2。

#### 1.4 *TaFKOR23* 基因在水杨酸、脱落酸和茉莉酸甲酯处理小麦 *TcLr15* 中的表达模式

为探讨外源激素 SA (2 mmol/L)、ABA (100  $\mu$ mol/L) 和 MeJA (200  $\mu$ mol/L)<sup>[25]</sup> 3 种激素对小麦 *TcLr15* 幼叶中 *TaFKOR23* 基因表达的影响, 在小麦一叶一心期分别于叶片表面喷施上述激素, 以 0.1% 酒精处理的同期小麦幼叶为对照, 于喷施后 0、0.5、2、6、12、24、48 h 分别剪取小麦第 1 片叶。RNA 提取等试验操作及数据分析同 1.2。

#### 1.5 *TaFKOR23* 基因在盐和干旱胁迫处理小麦 *TcLr15* 中的表达模式

为探讨非生物逆境对 *TaFKOR23* 基因表达的影响, 用 Hoagland's 营养液<sup>[26]</sup> 培养 *TcLr15* 至 3 叶期, 分别用终浓度 300 mmol/L NaCl<sup>[27]</sup> 和 10% PEG6000<sup>[28]</sup> 处理小麦根部。于处理后 0、0.5、2、6、12、24、48 h 分别剪取叶片, 以正常营养液培养

的同期叶片为对照。RNA 提取等操作及数据分析同 1.2。

#### 1.6 cDNA 文库筛选与 *TaFKOR23* 互作的靶蛋白

将 *TaFKOR23* 基因 ORF 区全长序列插入 pGBKT7 (BD) 的 c-Myc Epitope tag 下游, 构建诱饵载体, 引物序列见表 1, 并转化酵母菌株 Y187。含有诱饵载体的 Y187 与 *TcLr15* 小麦抗叶锈病性酵母 cDNA 文库进行杂交, 利用酵母双杂交方法筛选与 *TaFKOR23* 互作的靶蛋白。

#### 1.7 靶蛋白验证

为确保酵母双杂交结果的准确性, 进一步排除假阳性的干扰, 将得到的各靶蛋白进行全长克隆, 完整 ORF 区再与 pGADT7 (AD) 载体连接, 构建 AD-Prey 载体, 然后同诱饵载体 BD-*TaFKOR23* 进行共转验证, 并利用  $\beta$ -半乳糖苷酶检测阳性克隆, 以确认其互作情况。

表 1 研究中所用引物序列

Table 1 Primers used in the present study

引物名称 Primer name	序列 Sequence	片段大小 (bp) Product size	引物用途 Usage of the primer
TaFKOR23-S	5'-TTCATCGGACGCACAAAGAC-3'	1459	基因扩增
TaFKOR23-AS	5'-CGGCTATCCACCGAAATCAT-3'		基因扩增
qRT-TaGAPDH-S	5'-CTGCCTTGCTCCTCTTGCTAA-3'	98	qRT-PCR
qRT-TaGAPDH-AS	5'-CTTGATGGAAGGACCAGCAAC-3'		qRT-PCR
qRT-TaFKOR23-S	5'-TAACCCGCTGGCAAGGAAAT-3'	126	qRT-PCR
qRT-TaFKOR23-AS	5'-ACAGTAGATGACGAGACCAGCAG-3'		qRT-PCR
TaFKOR23- <i>Nde</i> I-S	5'-CGCATATGATGGCCTCGCCGTCGTCC-3'	1280	诱饵载体构建
TaFKOR23- <i>EcoR</i> I-AS	5'-GAATTCCTACAACCTCAACTGTACAAAGAG-3'		诱饵载体构建

## 2 结果与分析

### 2.1 *TaFKOR23* 基因的克隆及生物信息学分析

以接种 05-19-43 ②的 *TcLr15* 小麦幼叶 cDNA 为模板, 利用同源克隆的方法获得一个 1459 bp 的序列, 扩增结果如图 1A。编码区预测表明其完整 ORF 区长度为 1266 bp, 编码一个 421 aa 的多肽链, 无信号肽结构, 理论 pI 为 8.77, 属碱性蛋白; 该多肽链 N 端具有 F-box 结构域, 中间带有 2 个 Kelch 结构域 (图 1C), 属于 F-box/Kelch 类型基因。BLAST 结果表明, 该序列与粗山羊草中的 F-box/Kelch-repeat protein OR23 序列一致性最高 (95.08%), 小麦中尚未见该基因序列的报道, 故将其命名为 *TaFKOR23*

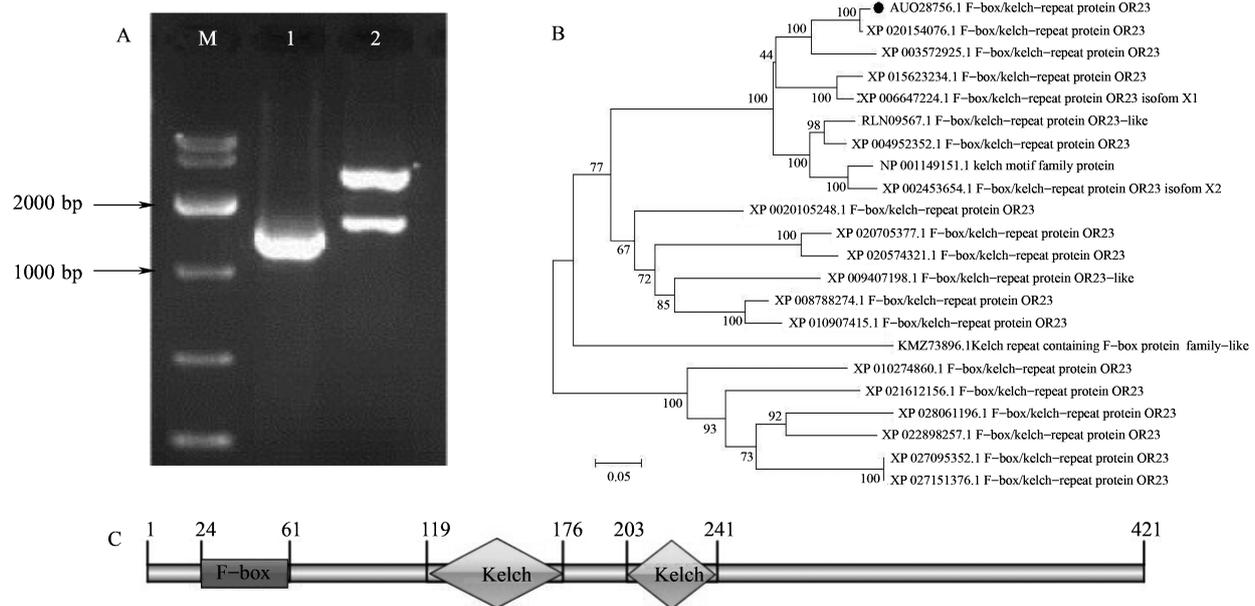
(KY552661.1)。将该基因所编码的蛋白序列进行 BLASTp 比对, 选取不同物种中同源性高的蛋白序列构建系统进化树。分析表明, *TaFKOR23* 与粗山羊草 (*Aegilops tauschii* Coss) 中的 F-box/Kelch-repeat protein OR23 同源性最高, 其次为二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv.) 的 F-box/Kelch-repeat protein OR23, 与同属于禾本科作物的粳稻 (*Oryza sativa* L.)、短花药野生稻 (*Oryza brachyantha* A.Chev. & Roehr.) 的同源蛋白亲缘关系也较近, 与玉米 (*Zea mays* L.)、高粱 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)、谷子 (*Setaria italica* (L.) P. Beauv.) 等的同源蛋白聚为一大类, 而与凤梨 (*Ananas comosus* (L.) Merr.)、石斛兰 (*Dendrobium catenatum* Lindl.)、莲 (*Nelumbo nucifera* Gaerth.) 等

植物的同源蛋白亲缘关系较远,且与该蛋白同源性最高的一个分支中均为单子叶植物(图 1B)。

用 DNAMAN 软件将 *TaFKOR23* 氨基酸序列与禾本科植物的 F-box/Kelch-repeat protein OR23 序列进行同源性比对。结果显示, *TaFKOR23* 氨基酸序列与粗山羊草 (*Aegilops tauschii* Coss.) 中的 F-box/Kelch-repeat protein OR23 相似性最高, 为 95.08%, 与二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv.) 相似度为 84.54%, 与梗稻 (*Oryza sativa* L.) 相似度为 79.39%, 与高粱 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) 的相似度最低, 为 75.18% (图 2)。且发现该蛋白的 F-box 结构域由 38 个 (24~61 位) 氨基酸残基组成, 其中 29~60 位氨基酸保守性极强。两个较保守的 Kelch 结构域分别位于 119~176、203~241 氨基酸处, 共有 59 个氨基酸残基在所选的禾本科植物中是完全一致的。

## 2.2 *TaFKOR23* 基因响应生物及非生物逆境胁迫过程

利用 qRT-PCR 方法对 *TaFKOR23* 基因在小麦不同部位及受叶锈菌侵染、应对外源激素及非生物逆境胁迫后的表达情况进行了表达模式分析。对小麦的 6 个不同部位进行特异性表达检测, 发现旗叶中的表达量显著高于其他部位, 约是幼叶表达量的 10 倍, 其他部位均呈低水平表达, 幼茎和雄蕊中的表达量最低, 低至幼叶的 1/10 (图 3)。*TaFKOR23* 受叶锈菌侵染后呈先降低再升高的表达趋势。亲和组合在接种后 0~12 h 的表达量与对照差异不大, 24 h 呈现最低表达, 随后开始升高, 至 96 h 表达量最高, 是未接种对照的 1.7 倍; 非亲和组合在接种叶锈菌后 24 h 内, 表达量均较对照显著降低, 约为对照表达量的一半, 48 h 猛增至对照的 1.3 倍左右。除 48 h 外, 亲和组合中 *TaFKOR23* 基因在接种后各时间点的表达量均略高于非亲和组合, 但在亲和及非亲和组合间的表达量并无明显差异 (图 4)。利用



A: *TaFKOR23* 基因扩增结果; M: DNA Marker DL10000; 1: *TaFKOR23* 基因全长扩增结果;

2: pGEM-*TaFKOR23* 单酶切结果; B: *TaFKOR23* 蛋白的系统发育树; C: *TaFKOR23* 蛋白结构域模式图

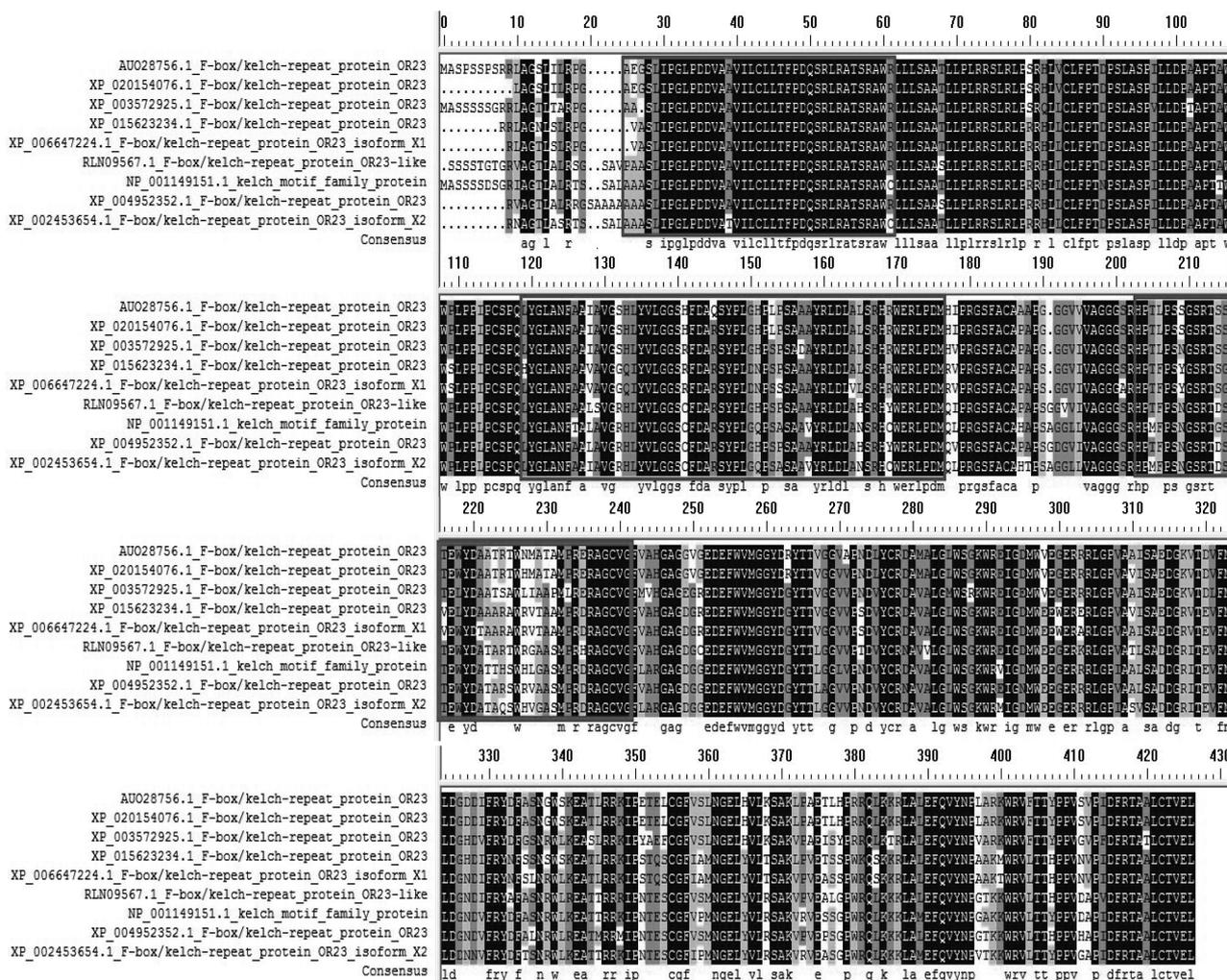
A: Amplification result of *TaFKOR23* gene, M: DNA Marker DL10000, 1: Amplification result of the full length of *TaFKOR23* gene,

2: Digestion result of pGEM-*TaFKOR23* with *Eco*R I, B: Phylogenetic tree of *TaFKOR23*, C: Domain pattern of *TaFKOR23*

AUO28756.1: *Triticum aestivum* L. 小麦, XP 020154076.1: *Aegilops tauschii* Coss. 粗山羊草, XP 003572925.1: *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. 二穗短柄草, XP 015623234.1: *Oryza sativa* L. 梗稻, XP 006647224.1: *Oryza brachyantha* A. Chev. & Roehr. 短花药野生稻, RLN09567.1: *Panicum miliaceum* L. 黍, XP 004952352.1: *Setaria italica* (L.) P. Beauv. 谷子, NP 001149151.1: *Zea mays* L. 玉米, XP 002453654.1: *Sorghum bicolor* (L.) Moench 高粱, XP 020105248.1: *Ananas comosus* (L.) Merr. 凤梨, XP 020705377.1: *Dendrobium catenatum* Lindl. 石斛兰, XP 020574321.1: *Phalaenopsis equestris* (Schauer) Rehb. f 小兰屿蝴蝶兰, XP 009407198.1: *Musa acuminata* subsp. *malaccensis* (Ridl.) N. W. Simmonds 马来西亚野生香蕉, XP 008788274.1: *Phoenix dactylifera* L. 海枣, XP 010907415.1: *Elaeis guineensis* Jacq. 油棕树, KMZ73896.1: *Zostera marina* L. 鳶草, XP 010274860.1: *Nelumbo nucifera* Gaerth. 莲, XP 021612156.1: *Manihot esculenta* Crantz 木薯, XP 028061196.1: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze 大叶茶, XP 022898257.1: *Olea europaea* var. *syvestris* (Mill.) Lehr 木犀榄, XP 027095352.1: *Coffea arabica* L. 小果咖啡, XP 027151376.1: *Coffea eugenioides* S. Moore 欧基尼奥伊德斯种咖啡树

图 1 小麦 *TcLr15* 中 *TaFKOR23* 基因扩增及系统进化分析

Fig.1 Amplification and phylogenetic analysis of *TaFKOR23* gene in wheat *TcLr15*



框线位置表示 TaFKOR23 蛋白的 F-box 结构域及 Kelch 结构域

The frames in the figure represent F-box domain and Kelch domain of TaFKOR23 protein, respectively, AUO28756.1: *Triticum aestivum* L. 小麦; XP\_020154076.1: *Aegilops tauschii* Coss. 粗山羊草; XP\_003572925.1: *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. 二穗短柄草; XP\_015623234.1: *Oryza sativa* L. 粳稻; XP\_006647224.1: *Oryza brachyantha* A. Chev. & Roehr. 短花药野生稻; RLN09567.1: *Panicum miliaceum* L. 黍; NP\_001149151.1: *Zea mays* L. 玉米; XP\_004952352.1: *Setaria italica* (L.) P. Beauv. 谷子; XP\_002453654.1: *Sorghum bicolor* (L.) Moench 高粱

图2 禾本科植物中 F-box/Kelch-repeat protein OR23 氨基酸序列比对

Fig.2 The diagram of amino acid sequence of F-box/Kelch-repeat protein OR23 in gramineous plants

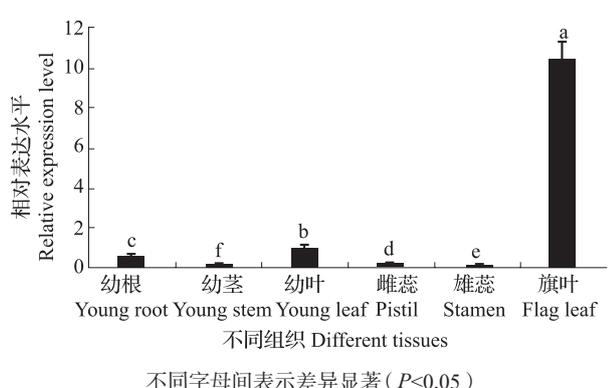


图3 *TaFKOR23* 基因在 *TcLr15* 小麦不同组织的表达模式  
Fig.3 Expression profile of *TaFKOR23* gene in different tissues of wheat *TcLr15*

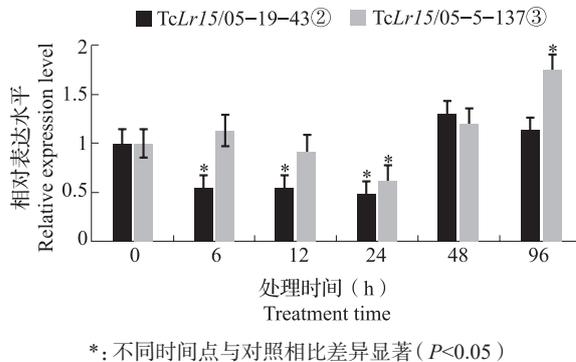


图4 叶锈菌侵染小麦 *TcLr15* 后 *TaFKOR23* 基因的表达模式  
Fig.4 Expression profiles of *TaFKOR23* gene in wheat *TcLr15* inoculated with *Puccinia triticina* Eriks

ABA、SA 和 MeJA 3 种激素分别处理 *TcLr15* 小麦叶片, *TaFKOR23* 均在 12 h 呈现最高表达, 表达量分别是对照的 2.4 倍、2.2 倍和 2.9 倍, 随后表达量略降低, 但仍高于对照(图 5)。PEG 处理后, 该基因在处理后的 48 h 内, 表达量没有显著变化, 但经 NaCl 处理后, *TaFKOR23* 的表达量在 2 h、6 h、24 h 和 48 h 均上调表达, 其中 6 h、24 h 和 48 h 的表达量达到显著水平, 在所检测的时间范围内, 48 h 时表达量最大, 约为对照的 2.3 倍(图 6)。

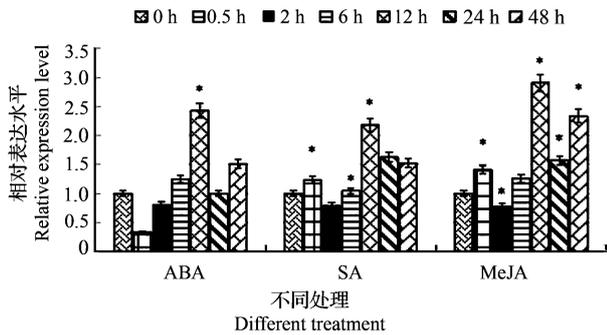


图 5 不同激素处理小麦 *TcLr15* 后 *TaFKOR23* 基因的表达模式

Fig.5 Expression profiles of *TaFKOR23* gene in wheat *TcLr15* treated by different hormones

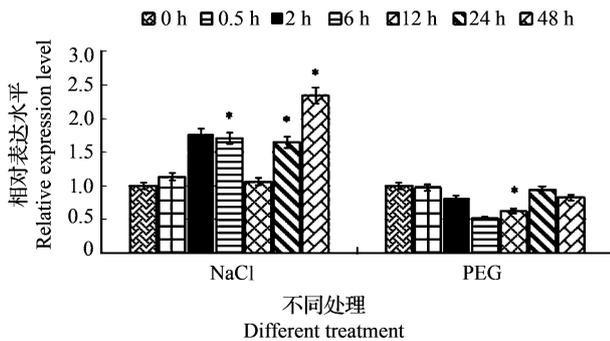
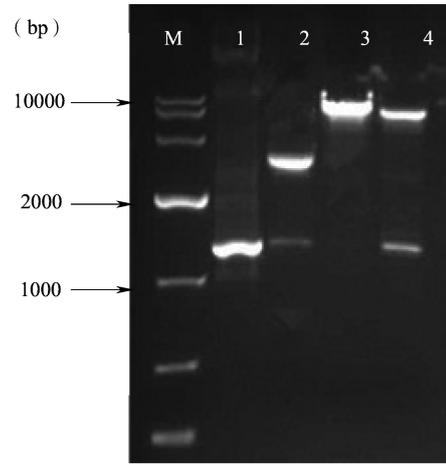


图 6 非生物逆境胁迫下小麦 *TcLr15* 中 *TaFKOR23* 基因的表达模式

Fig.6 Expression profiles of *TaFKOR23* gene in wheat *TcLr15* treated with NaCl and PEG

### 2.3 与 *TaFKOR23* 互作的靶蛋白的筛选

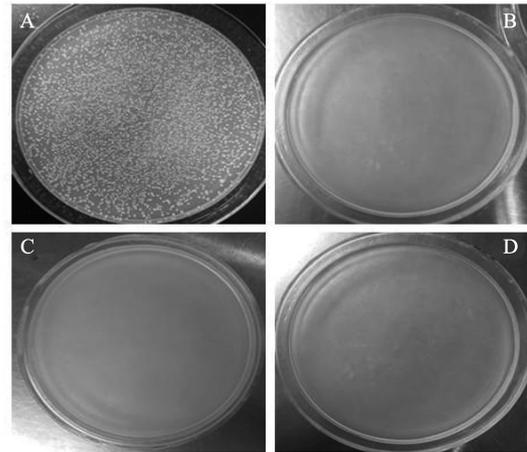
成功构建 BD-*TaFKOR23* 诱饵载体(图 7)并转入酵母菌株 Y187 中, 分别涂布于 SD/-Trp(一缺)、SD/-Trp/-Leu(二缺)、SD/-Trp/-Leu/-His(三缺)、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade(四缺)缺陷平板上, 以验证诱饵载体的毒性和自激活作用(图 8)。结果显示, 含有诱饵载体的 Y187 布满一缺平板, 表明诱饵载体无毒性, 于二缺、三缺和四缺平板上不生长, 故诱饵载体无自激活活性。



M: DNA marker DL10000; 1: *TaFKOR23* ORF 区(1266 bp)扩增结果; 2: pGEM-*TaFKOR23* 经 *Nde* I 和 *Eco*R I 酶切结果; 3: BD 空载体; 4: 诱饵载体 BD-*TaFKOR23* 经 *Nde* I 和 *Eco*R I 酶切结果

图 7 *TaFKOR23* 基因诱饵载体构建

Fig.7 Bait vector construction of *TaFKOR23* gene



A: 含有 BD-*TaFKOR23* 诱饵载体的 Y187(下同)在一缺培养基上生长情况; B: 在二缺培养基上生长情况; C: 在三缺培养基上生长情况; D: 在四缺培养基上生长情况

A: Y187 containing BD-*TaFKOR23* (the same as below) grew on SD/-Trp medium, B: grew on SD/-Trp/-Leu medium, C: grew on SD/-Trp/-Leu/-His medium, D: grew on SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade medium

图 8 BD-*TaFKOR23* 诱饵载体毒性及自激活活性检测  
Fig.8 Detection of toxicity and self-activation activity of bait vector BD-*TaFKOR23*

利用酵母文库筛选技术, 经两轮四缺培养基筛选共得到 136 个单克隆。再以 1:1、1:10、1:100 稀释倍数重新在四缺培养基平板上划线培养, 有 64 个单克隆可以在四缺平板上生长良好, 将这些单克隆利用四缺液体培养基摇菌。经菌落 PCR 扩增,

单一 PCR 产物的克隆送北京中科希林生物科技有限责任公司进行测序分析。将得到的测序结果在 NCBI 网站上进行 BLASTx 比对,证实 Skp1/ASK1-

like protein、ADP-ribosylation factor 2-like isoform X1 等 11 类 64 个蛋白可能与 TaFKOR23 存在互作 (表 2)。

表 2 TaFKOR23 文库筛选结果

Table 2 Results of library screening with TaFKOR23

序号 Number	登录号 Accession No.	蛋白名称 Protein name	克隆数目 Number of clones
1	AEL00112.1	Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial	38
2	AAP79890.1	Skp1/ASK1-like protein	1
3	XP_015611313.1	ADP-ribosylation factor 2-like isoform X1	1
4	BAB82472.1	Chitinase 2	1
5	XP_020168309.1	SEC1 family transport protein SLY1	1
6	XP_020187773.1	NADH dehydrogenase [ ubiquinone ] 1 beta subcomplex subunit 9	7
7	EMS66018.1	Glucan endo-1, 3-beta-glucosidase 14	3
8	XP_020183912.1	Protein DETOXIFICATION 44	1
9	XP_014754759.1	Leucine-rich repeat protein 1 ( LRR-8 Superfamily )	1
10	PHT26166.1	Regulator of rDNA transcription protein 15	1
11	CAE45949.1	Hypothetical protein	9

## 2.4 一对一回复验证

根据试验目的,将酵母文库筛选结果中编码 Skp1、Rubisco、SLY1、Chitinase2、ADP、Leucine-rich repeat protein 1、Glucan endo-1, 3-beta-glucosidase 14 蛋白的基因进行全长编码区克隆,并成功构建 AD-Prey 重组质粒,将这些质粒分别与 BD-TaFKOR23 共转入酵母菌 AH109 中,进行一对一互作验证(图 9)。BD-TaFKOR23 与 AD-TaSLY1, BD-TaFKOR23 与 AD-TaSkp1, BD-TaFKOR23 与 AD-TaChitinase2 共转入 AH109 酵母菌后,均可在四缺平板上生长良好,β-半乳糖苷酶检测后 3 个组合均呈现蓝色。AD-Rubisco、AD-ADP、AD-Leucine-rich repeat protein 1、AD-Glucan endo-1, 3-beta-glucosidase 14 分别与 BD-TaFKOR23 共转入 AH109 酵母菌后,在四缺平板上均不生长。综上,酵母双杂交实验结果表明,TaFKOR23 与 TaSkp1、TaSLY1 和 TaChitinase2 均可能存在相互作用。

## 2.5 TaSkp1、TaSLY1 和 TaChitinase2 生物信息学分析

进一步对 3 个可能与 TaFKOR23 有互作关系的蛋白进行了生物信息学分析。结果显示, TaSkp1

基因编码的蛋白分子量为 19.06 kD,理论 pI 为 4.45,具有一个 Skp1 结构域。TaSLY1 基因编码的蛋白分子量为 45.34 kD,理论 pI 为 5.60,具有 Sec1 结构域。TaChitinase2 基因编码的蛋白分子量为 34.17 kD,理论 pI 为 6.30,包含几丁质结合域 (ChTBD1) 和糖苷水解酶 19 (Glyco hydro 19) 2 个结构域(表 3)。

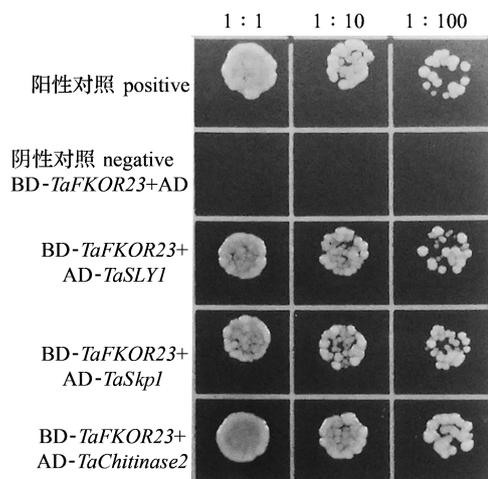


图 9 蛋白一对一互作验证结果  
Fig.9 Protein interactions by yeast two hybridization

表 3 *TaSkp1*、*TaSLY1* 和 *TaChitinase2* 基因生物信息学分析Table 3 Bioinformatic analyses of *TaSkp1*, *TaSLY1* and *TaChitinase2* genes

项目 Items	小麦 S- 期激酶相关蛋白 <i>TaSkp1</i>	小麦 SEC1 家族运输蛋白 SLY1 <i>TaSLY1</i>	小麦几丁质酶 2 <i>TaChitinase2</i>
ORF 区长度 (bp) ORF length	528	1233	972
氨基酸 (aa) Amino acid	175	411	324
等电点 Isoelectric point	4.45	5.60	6.30
分子量 (kD) Molecular weight	19.06	45.34	34.17
结构域 Domain	Skp1	Sec1	ChtBD1、Glyco hydro 19
亚细胞定位 Subcellular localization	细胞核	细胞质	液泡
信号肽结构 Signal peptide structure	无	无	有

### 3 讨论

普通小麦是异源六倍体,基因组庞大且复杂(是水稻基因组的 40 倍、人类基因组的 5.5 倍),其功能基因组学研究远远落后于拟南芥和水稻等模式植物。小麦全基因组测序虽已完成<sup>[29-30]</sup>,但尚未见 F-box 基因家族在小麦中存在数量及类型的系统性报道。基于此,本实验室已对小麦中 F-box 家族基因进行了系统地鉴定、分类及进化相关分析(为未发表资料)。在这些分析的基础上,发现了本实验的研究对象——*TaFKOR23* 基因,该基因具有 2 个 Kelch 结构域,属于典型的 F-box/Kelch 亚家族基因。

为探究 *TaFKOR23* 是否响应逆境的变化,本研究分别对 *TcLr15* 受叶锈菌侵染、响应激素、受非生物逆境处理后 *TaFKOR23* 基因的表达模式进行分析。结果表明,该基因虽然响应叶锈菌的侵染,但在抗/感组合间的差异不明显,推测其在小麦 *TcLr15* 抗/感叶锈病过程中的作用不大。拟南芥中的 F-box 蛋白 AtPP2-B11 与 AtLEA14 协同作用在抵御盐胁迫过程中发挥功能<sup>[31]</sup>。经盐胁迫处理后 *TaFKOR23* 基因呈明显上调表达,表明该基因可能主要参与对非生物逆境尤其是盐胁迫的抵御过程。紫花苜蓿中的 F-box 基因 *MsFTL* 受低温、盐和 ABA 等诱导显著表达,表明紫花苜蓿中该基因与逆境胁迫过程密切相关<sup>[32]</sup>;拟南芥中鉴定的 F-box 基因 *AtFBS1* 也同样响应 MeJA 和 ABA 信号途径<sup>[19]</sup>。本研究的结果表明 *TaFKOR23* 响应 SA、ABA 和 MeJA 3 种激素的处理,受 MeJA 和 ABA 的影响更大。由于 qRT-PCR 仅在转录水平上反映基因的表达情况,*TaFKOR23* 在蛋白水平是否也受到这些因

素的影响仍需进一步探究。

据报道,Skp1/ASK1 是 SCF (Skp1-CUL1-F-box protein) 复合体的组分,能够与 F-box 蛋白中的 F-box 结构域直接结合,从而参与靶蛋白的泛素化过程<sup>[33]</sup>。由 *TaFKOR23* 与 *TaSkp1* 存在相互作用的结果可以推测,*TaFKOR23* 可能为 SCF 复合物成员。SLY1 属于 SEC1 家族蛋白,Toonen 等<sup>[34]</sup>研究表明,酵母中 SLY1 的突变对于内质网及高尔基体的转运至关重要。但 SEC1 蛋白的研究目前主要集中在酵母、线虫、大鼠中,植物中鲜见报道。拟南芥 SEC1 家族蛋白 AtVPS45 在其囊泡运输过程中发挥作用<sup>[35]</sup>,另一个 SEC1 家族成员 KEULE 于拟南芥各部位均有表达,并参与其胞质分裂过程<sup>[36]</sup>。而对于 SLY1 在植物中的功能还是未知的。本研究初步证实 *TaFKOR23* 与 *TaSLY1* 存在相互作用,推测 SEC1 家族蛋白 SLY1 可能为 F-box 蛋白 *TaFKOR23* 特异性识别底物,并通过形成 SCF 复合体参与植物抵御逆境的过程。几丁质酶在植物对病原菌和害虫的防御过程中发挥着重要作用<sup>[37-38]</sup>,同时也参与了植物对非生物胁迫的应答<sup>[39]</sup>。对 *TaChitinase2* 的生物信息学分析表明,*TaChitinase2* 的 N-末端具有富含半胱氨酸的几丁质结合区,C-末端是催化区,故确定本研究获得的 *TaChitinase2* 属于 I 类几丁质酶。据报道,烟草中的 I 类几丁质酶定位于植物液泡中,并通过在体外裂解菌丝尖端的细胞壁,将液泡内物质释放于胞外从而抑制许多真菌的生长<sup>[40]</sup>。经预测本研究中获得的 *TaChitinase2* 具有信号肽,并且亚细胞定位预测其定位于液泡中。由 *TaFKOR23* 与 *TaChitinase2* 存在相互作用的结果推测,*TaFKOR23* 可能与 Chitinase 协同在小麦应对叶锈病菌的侵染及盐胁迫过程中发挥作用。

## 参考文献

- [ 1 ] 刘相元, 胡弘历, 欧阳华芳, 高大明. CRL E3 泛素连接酶复合体研究进展. 中国细胞生物学学报, 2014, 36(2): 157-168  
Liu X Y, Hu H L, Ouyang H F, Gao D M. CRL E3 complexes: assembled for destruction. Chinese Journal of Cell Biology, 2014, 36(2): 157-168
- [ 2 ] Risseuw E P, Daskalchuk T E, Banksy T W, Liu E W, Cotelesagez J, Hellmann H, Estelleo M, Somers D E, William L C. Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from *Arabidopsis*. Plant Journal, 2003, 34: 753-767
- [ 3 ] Kipreos E T, Michele P. The F-box protein family. Genome Biology, 2000, 1(5): 1-7
- [ 4 ] Jain M, Nijhawan A, Arora R, Agarwal P, Ray S, Sharma P, Kapoor S, Tyagi A K, Khurana J P. Genome-wide analysis, classification, temporal and spatial gene expression during panicle and seed development, and regulation by light and abiotic stress. Plant Physiology, 2007, 143(4): 1467-1483
- [ 5 ] Hermand D. F-box proteins: more than baits for the SCF? Cell Division, 2006, 1: 30-35
- [ 6 ] Ou C Y, Pi H, Chien C T. Control of protein degradation by E3 ubiquitin ligases in *Drosophila* eye development. Trends in Genetics, 2003, 19(7): 382-389
- [ 7 ] 霍冬英, 郑炜君, 李盼松, 徐兆师, 周永斌, 陈明, 马有志, 闵东红, 张小红. 谷子 F-box 家族基因的鉴定、分类及干旱响应. 作物学报, 2014, 40(9): 1585-1594  
Huo D Y, Zheng W J, Li P S, Xu Z S, Zhou Y B, Chen M, Ma Y Z, Min D H, Zhang X H. Identification, classification and drought response of F-box gene family in foxtail millet. Acta Agronomica Sinica, 2014, 40(9): 1585-1594
- [ 8 ] Shefali G, Vanika G, Chandra K, Bhatia S. Genome-wide survey and expression analysis of F-box genes in chickpea. BMC Genomics, 2015, 16(1): 67-81
- [ 9 ] Gagne J M, Downes B P, Shiu S H, Durski A M, Vierstra R D. The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(17): 11519-11524
- [ 10 ] 秘彩莉, 刘旭, 张学勇. F-box 蛋白质在植物生长发育中的功能. 遗传, 2006, 28(10): 1337-1205  
Bi C L, Liu X, Zhang X Y. The function of F-box protein in plant growth and development. Hereditas, 2006, 28(10): 1337-1342
- [ 11 ] 张玉娥. 拟南芥保卫细胞特异表达的 F-box 蛋白 DOR 负向调节耐旱性. 北京: 中国农业大学, 2005  
Zhang Y E. A guard cell specific F-box protein DOR negatively regulates drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Beijing: China Agricultural University, 2005
- [ 12 ] Zhang Y, Xu W, Li Z, Deng X W, Wu W, Xue Y. F-box protein DOR functions as a novel inhibitory factor for abscisic acid-induced stomatal closure under drought stress in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 2008, 148(4): 2121-2133
- [ 13 ] Remans T, Smeets K, Opdenakker K, Mathijsen D, Vangronsveld J, Cuypers A. Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. Planta, 2008, 227(6): 1343-1349
- [ 14 ] Piisilä M, Keceli M A, Brader G, Jakobson L, Joesaar I, Sipari N, Kollist H, Palva E T, Kariola T. The F-box protein MAX2 contributes to resistance to bacterial phytopathogens in *Arabidopsis thaliana*. BMC Plant Biology, 2015, 15: 53
- [ 15 ] Karolina S, Nausicaä L, Yafei Z, Lore E, Jonas V H, Bassam A A, van Damme E J M. Glycan-binding F-box protein from *Arabidopsis thaliana* protects plants from *Pseudomonas syringae* infection. BMC Plant Biology, 2016, 16: 213
- [ 16 ] Guo M Y, Su N, Zheng J, Huai J L, Wu G H, Zhao J F, He J G, Tang D Z, Yang S H, Wang G Y. An F-box gene, *CPR30*, functions as a negative regulator of the defense response in *Arabidopsis*. Plant Journal, 2009, 60: 757-770
- [ 17 ] Kim H S, Delaney T P. *Arabidopsis* SON1 is an F-box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance. Plant Cell, 2002, 14: 1469-1482
- [ 18 ] Maldonado-Calderón M T, Sepúlveda-García E, Rocha-Sosa M. Characterization of novel F-box proteins in plants induced by biotic and abiotic stress. Plant Sciences, 2012, 185-186: 208-217
- [ 19 ] Curtis R H, Pankaj Stephen J P, Johnathan N. The *Arabidopsis* F-box/Kelch-repeat protein At2g44130 is upregulated in giant cells and promotes nematode susceptibility. Molecular Plant Microbe Interaction, 2013, 26(1): 36-43
- [ 20 ] Imaizumi T, Schultz T F, Harmon F Q, Lindsey A H, Steve A K. FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. Science, 2005, 309: 293-297
- [ 21 ] Imaizumi T, Tran H G, Swartz T E, Briggs W R, Kay S A. FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signaling in *Arabidopsis*. Nature, 2003, 426: 302-306
- [ 22 ] Kolmer J A. Genetics of resistance to wheat leaf rust. Annual Review of Phytopathology, 1996, 34: 435-455
- [ 23 ] Dholakia B B, Rajwade A V, Hosmani P, Khan R R, Chavan S, Reddy D M R, Lagu M D, Bansal U K, Saini R G, Gupta V S. Molecular mapping of leaf rust resistance gene *Lr15* in hexaploid wheat. Molecular Breeding, 2013, 31: 743-747
- [ 24 ] Roelfs A P, Bushnell W R. The cereal rust vol 1: origins, specificity, structure, and physiology. Orlando: Academic Press, 1984: 131-164
- [ 25 ] 刘巍. 小麦抗条锈病基因 *Yr10* 及防卫相关基因 *TaMDHAR4* 的功能分析. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014  
Liu W. Functional analysis of wheat stripe rust resistance genes *YR10* and defense-related gene *TAMDHAR4*. Yangling: Northwest A&F University, 2014
- [ 26 ] 李凤童, 陈秀兰, 刘春贵, 孙叶, 马辉, 张甜, 包建忠. 不同配方营养液对水培风信子生长及观赏品质的影响. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(10): 130-134  
Li F T, Chen X L, Liu C G, Sun Y, Ma H, Zhang T, Bao J Z. Effects of different nutrient solutions on growth and ornamental quality of hydroponic *Hyacinthus orientalis* L. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2012, 32(10): 130-134
- [ 27 ] 杨利艳, 韩蓉.  $\text{Ca}^{2+}$  对小麦萌发及幼苗抗盐性的效应. 植物学报, 2011, 46(2): 155-161  
Yang L Y, Han R. Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  on wheat germination and seedling development under saline stress. Chinese Bulletin of Botany, 2011, 46(2): 155-161
- [ 28 ] 曹勇, 姬虎太, 裴雪霞, 郑军, 王敏, 马小飞, 李晓丽. PEG 模

- 拟干旱胁迫下 6 份冬小麦种子抗旱性评价. 山西农业科学, 2016, 44 ( 6 ): 723-725
- Cao Y, Ji H T, Pei X X, Zheng J, Wang M, Ma X F, Li X L. Evaluation of drought resistance of six winter wheat seeds under PEG simulated drought stress. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2016, 44 ( 6 ): 723-725
- [ 29 ] Brenchley R, Spannagl M, Pfeifer M, Barker G L, D' Amore R, Allen A M, McKenzie N, Kramer M, Kerhornou A, Bolser D, Kay S, Waite D, Trick M, Bancroft I, Gu Y, Huo N, Luo M C, Sehgal S, Gill B, Kianian S, Anderson O, Kersey P, Dvorak J, McCombie W R, Hall A, Mayer K F, Edwards K J, Bevan M W, Hall N. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. Nature, 2012, 491 ( 7426 ): 705-710
- [ 30 ] The International Wheat Genome Sequencing Consortium, Rudi A, Kellye E, Nils S, et al. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. Science, 2018, 361 ( 6403 ): 6403-7191
- [ 31 ] Li Y Z, Jia F J, Yu Y L, Lu L, Huang J G, Yang G D, Wu C G, Zheng C C. The SCF E3 ligase AtPP2-B11 plays a negative role in response to drought stress in *Arabidopsis*. Plant Molecular Biology Reporter, 2014, 32 ( 5 ): 943-956
- [ 32 ] 陈秀秀, 张彤, 余倩文, 周薇, 安逸民, 杜秉昊, 郭长虹. 紫花苜蓿 F-box 蛋白基因 *MsFTL* 的克隆及功能分析. 植物遗传资源学报, 2019, 20 ( 3 ): 750-759
- Chen X X, Zhang T, Yu Q W, Zhou W, An Y M, Du B H, Guo C H. Cloning and functional analysis of F-box protein gene *MsFTL* in alfalfa (*Medicago sativa* L. ). Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20 ( 3 ): 750-759
- [ 33 ] 刘卫霞, 彭小忠, 袁建月, 强伯勤. SCF ( Skp1-Cul1-F-box 蛋白 ) 复合物及其在细胞周期中的作用. 中国生物工程杂志, 2002, 22 ( 3 ): 1-3
- Liu W X, Peng X Z, Yuan J Y, Qiang B Q. SCF ( Skp1-Cul1-F-box protein ) complex and its function in cell cycle. Journal of Chinese Biotechnology, 2002, 22 ( 3 ): 1-3
- [ 34 ] Toonen Ruud F G, Verhage M. Vesicle trafficking: pleasure and pain from *SM* genes. Trends in Cell Biology, 2003, 13 ( 4 ): 177-186
- [ 35 ] Zouhar J, Rojo E, Bassham D C. AtVPS45 is a positive regulator of the SYP41/SYP61/VTI12 SNARE complex involved in trafficking of vacuolar cargo. Plant Physiology, 2009, 149 ( 4 ): 1668-1678
- [ 36 ] Farhah F A, Yoann H, Ulrike M, Gerd J. The cytokinesis gene *KEULE* encodes a Sec1 protein that binds the syntaxin KNOLLE. The Journal of Biology, 2001, 152 ( 3 ): 531-544
- [ 37 ] 程笑笑, 冯自力, 冯鸿杰, 赵丽红, 师勇强, 李志芳, 朱荷琴. 真菌源几丁质酶在植物抗真菌病害中的应用. 植物保护, 2017, 43 ( 3 ): 29-35
- Cheng X X, Feng Z L, Feng H J, Zhao L H, Shi Y Q, Li Z F, Zhu H Q. Applications of fungal chitinase in the fungal disease-resistant plants. Plant Protection, 2017, 43 ( 3 ): 29-35
- [ 38 ] Toyoda H, Matsuda Y, Yamaga T, Ikeda S, Morita M, Tamai T, Ouchi S. Suppression of the powdery mildew pathogen by chitinase microinjected into barley coleoptile epidermal cells. Plant Cell Reports, 1991, 10 ( 5 ): 217-220
- [ 39 ] 巩凯玲, 陈双慧, 纪晓晨, 林怡容, 张荃. 植物几丁质酶的研究进展. 分子植物育种, 2019, 20 ( 16 ): 6840-6849
- Gong K L, Chen S H, Ji X C, Lin Y R, Zhang Q. Advances in research of plant chitinases. Molecular Plant Breeding, 2018, 20 ( 16 ): 6840-6849
- [ 40 ] Melchers L S. A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. Plant Journal, 1994, 4 ( 5 ): 469-480