

网络出版时间: 2025-07-09

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/61.1359.S.20250709.1153.008>

小麦 E3 泛素连接酶基因 *TaPUB23* 克隆及功能分析

李海, 路云爽, 师一峰, 李宇翔, 胡小平

(西北农林科技大学植物保护学院, 植物资源与病虫害治理教育部重点实验室,

农业农村部西北黄土高原作物有害生物综合治理重点实验室, 陕西杨凌 712100)

摘要: 为探究小麦品种小偃 6 号高温全生育期抗条锈性分子机理, 基于前期转录组测序结果, 筛选到 1 个在条锈菌侵染及温度双重诱导下表达量显著上调的 E3 泛素连接酶基因 *TaPUB23*, 其序列全长 1 272 bp, 编码 423 个氨基酸, 定位于细胞膜、细胞质和细胞核。病毒介导 *TaPUB23* 瞬时过表达能显著降低小偃 6 号植株对条锈病的抗性。利用酵母双杂交筛选到 *TaPUB23* 的互作靶标 *TaDJA7*, *TaPUB23* 可对靶标进行泛素化修饰, 进一步通过荧光素酶互补(LCA)、双分子荧光互补(BiFC)及 Pull-down 试验验证了其互作关系。以上结果说明 E3 泛素连接酶 *TaPUB23* 通过泛素化修饰 *TaDJA7*, 从而调控小麦的高温抗锈性过程。

关键词: 小麦条锈病; E3 泛素连接酶; *TaPUB23*; *TaDJA7*

中图分类号: S512.1; S330

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2026)02-0154-10

Cloning and Function Analysis of E3 Ubiquitin Ligase Gene *TaPUB23* in Wheat

LI Hai, LU Yunshuang, SHI Yifeng, LI Yuxiang, HU Xiaoping

(Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Integrated Management of Ministry of Education, Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northwestern Loess Plateau, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: To investigate the molecular mechanism of high-temperature all-stage stripe rust resistance in Xiaoyan 6, an E3 ubiquitin ligase gene, *TaPUB23*, was identified based on the previous transcriptome sequencing results. This gene, which was significantly upregulated under both stripe rust infection and high-temperature conditions, has a full-length sequence of 1,272 bp, encoding 423 amino acids, and is localized in the cell membrane, cytoplasm, and nucleus. Virus-induced transient overexpression of *TaPUB23* significantly reduced the stripe rust resistance of Xiaoyan 6 plant. Based on the yeast two hybrid(Y2H) system, we identified the interaction target *TaDJA7* of *TaPUB23* and demonstrated that *TaPUB23* ubiquitinated *TaDJA7*. The interaction between *TaPUB23* and *TaDJA7* was further validated through luciferase complementation assays(LCA), bimolecular fluorescence complementation(BiFC), and Pull-down assays. These findings reveal that the E3 ubiquitin ligase *TaPUB23* regulates high-temperature all-stage stripe rust resistance in wheat through ubiquitination of *TaDJA7*.

Keywords: Wheat stripe rust; E3 ubiquitin ligase; *TaPUB23*; *TaDJA7*

小麦(*Triticum aestivum*)为中国主粮作物之一,其种植面积约占粮食作物种植面积的 20%(<https://www.stats.gov.cn> 国家统计局, 2024)。小

麦条锈病是由条形柄锈菌(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)引起的小麦主要病害之一,具有爆发性强、流行范围广等特点,是典型的气传真菌性

收稿日期: 2025-03-28

修回日期: 2025-04-29

基金项目: 国家现代农业(小麦)产业技术体系项目(CARS-03-37); 科技部国际合作项目(G2023172013L); 西北农林科技大学推广项目(TGZX2021-13); 西北农林科技大学高水平创新团队项目(XYTD2023-04)

第一作者 E-mail: 2250575131@qq.com(李海)

通讯作者 E-mail: xphu@nwsuaf.edu.cn(胡小平)

病害,其发生会造成小麦产量与品质下降^[1]。防治小麦条锈病最为有效的措施是培育和种植抗病品种。由于条锈菌生理小种的不断变异,小麦生产上部分抗病品种会因为抗性失效而被很快淘汰,因此采用非小种专化性的持久抗病品种是防治小麦条锈病最为有效的策略之一^[2]。其中,小麦在较高温度条件下表现出的低反应型抗病特性即小麦高温抗锈性,具有非小种专化性的特点^[3-6]。自 1980 年以来,大量学者对小麦高温抗条锈性进行了研究,成功筛选出以小偃 6 号为代表的一批具有高温抗条锈性的小麦品种^[7-8],并对其高温抗锈性的生化机制^[9]、组织病理学特征^[10-11]、表达规律^[12-13]、转录组表达特征^[14-15]等方面进行了深入分析。研究表明,多种类受体激酶(RLKs) *TaSERK1*、*TaCRK10*^[16-17], *R* 基因 *TaRPS2*、*TaRPM1*^[18-19], 条锈菌效应因子 *PSTG_01766*、*PSTG_11208*^[20-22] 以及 *WRKY* 转录因子 *TaWRKY49*、*TaWRKY62*、*TaWRKY76* 等^[23-25] 参与了温度对小偃 6 号全生育期抗锈性的调控。然而,关于小偃 6 号高温全生育期抗锈性的蛋白质降解分子机制仍缺乏系统研究。

植物在应对病原菌侵染时会启动由蛋白质合成与降解共同调控的复杂防御机制,其中泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)和细胞自噬是介导蛋白质降解的两条主要途径。UPS 是一种高度保守且高效的降解系统,约 80% 的真核生物蛋白质降解都依赖于此^[26]。E3 泛素连接酶通过调控激素信号、抗病蛋白稳定性及病原菌效应蛋白的清除,成为连接 UPS 与生物胁迫响应的核心枢纽^[27-28]。研究发现,植物免疫反应均受 UPS 的调控,其中 E3 泛素连接酶起着关键作用^[26]。例如,水稻中 RING 型 E3 泛素连接酶 *OsRGLG5* 通过降解稻瘟病菌的效应因子 *Avr-Pi9*,正向调节水稻对稻瘟病菌的抗性^[29];拟南芥中黄萎病菌 *Asp f2* 类外泌蛋白 *VDAL* 通过竞争性结合 E3 泛素连接酶 *PUB25/26* 来减轻其对 *MYB6* 病菌响应因子的降解,从而增强植株对黄萎病的抗性^[30]。此外,水稻钙依赖蛋白激酶 *Os-CPK17* 与 E3 泛素连接酶 *OsPUB12* 通过磷酸化、泛素化等翻译后修饰,精细调控水稻免疫核心元件 *OsRLCK176* 蛋白的积累,以维持水稻免疫

稳态^[31]。因此,了解 E3 泛素连接酶对底物的特异性识别及其调控的一系列免疫反应,对植物抗病品种的鉴定与培育具有重要意义。

目前,E3 泛素连接酶在植物抗病和逆境响应中已进行大量研究,但针对 E3 泛素连接酶在小麦高温全生育期抗锈性过程中的研究尚未见报道。本研究通过对前期实验室转录组结果分析,筛选出在条锈菌侵染及温度双重诱导下表达量显著增高的小麦 E3 泛素连接酶基因 *TaPUB23*,以小麦品种小偃 6 号和条锈菌生理小种 *CYR32* 为试验材料,通过病毒介导的过表达、酵母双杂交、LCA、BiFC、Pull-down 及体外泛素化等方法,明确了小麦 E3 泛素连接酶 *TaPUB23* 的分子调控机制,以为小麦高温全生育期抗条锈病的解析提供重要的分子理论基础。

1 材料方法

1.1 材料

本研究供试材料包括两个小麦品种(小偃 6 号,高温抗条锈品种;铭贤 169,条锈敏感品种)、本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)、小麦条锈菌生理小种 *CYR32*、大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态 Trans 5α 和 BL21(DE3)、农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)感受态 GV3101 和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) Y2HGold。小麦采用 16 h 光照(16 °C)/8 h 黑暗(12 °C)的光周期培养,本氏烟草在 25 °C 恒温条件下培养。供试载体有 *VOX*、*pGADT7*、*pGBKT7*、*pER8-CeYFP*、*pER8-NeYFP*、*pCambia1302-eGFP*、*pCambia1302-RFP*、*p16318-eGFP*、*pCambia1300-nLUC*、*pCambia1300-cLUC*、*pGEX-4T*、*pMAL-MBP*。

1.2 载体构建

研究组前期通过对小偃 6 号高温全生育期抗锈性转录组测序分析,筛选到 E3 泛素连接酶基因 *TaPUB23*;利用酵母双杂交系统筛选 *TaPUB23* 互作靶标;使用同源重组法构建 *VOX-TaPUB23*、*pCambia1302-eGFP-TaPUB23*、*pCambia1302-RFP-TaPIP2*、*pCambia1302-RFP-TaWRKY33*、*p16318-eGFP-TaPUB23*、*pGADT7-TaDJA7*、*pGBKT7-TaPUB23*、*pCambia1300-nLUC-TaPUB23*、*pCambia1300-cLUC-TaDJA7*、*pER8-TaPUB23-CeYFP*、*pER8-TaDJA7-NeYFP*、*pMBP-TaPUB23*、*pGEX-TaDJA7* 重组载体,引物序列参照表 1。

表 1 本试验所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence	作用 Function
TaPUB23-F	AACCTGGTCAGCTTCTTCTTAG	TaPUB23 全长 cDNA Full cDNA of TaPUB23
TaPUB23-R	GTCTTGGATTGTGCTATGTAC	
qPCR-Ta26S-F	GCTGGCTCGTTCAACTGATG	qRT-PCR
qPCR-Ta26S-R	GGACCAAGCGTTCTGATTACTC	
qPCR-TaPUB23-F	CGTACTTCCTGTGCCCCGAT	
qPCR-TaPUB23-R	GAGCTTTTGCTGCGTGACGG	
VOX-TaPUB23-F	acttcggctaaggaagggccATGGAGGGGACGTCGGTGGA	BSMV 过表达 BSMV overexpression
VOX-TaPUB23-R	aggccagccaccgcaccagTCAGCAAGGGTAATACGCCT	
p1302-eGFP-TaPUB23-F	cgacgggtaccgggggcccATGGAGGGGACGTCGGTGGA	亚细胞定位 Subcellular localization
p1302-eGFP-TaPUB23-R	ttccaggatcccggggcccGCAAGGGTAATACGCCTTGA	
p1302-RFP-TaPIP2-F	cgacgggtaccgcgggcccATGTCCAAGGAGGAGGTGATCGC	
p1302-RFP-TaPIP2-R	atccaggatcccggggcccAGATCTGTACAGCTCCTCCATGC	
p1302-RFP-TaWRKY33-F	cgacgggtaccgcgggcccATGACTACCTCGTCGTCAGGGA	
p1302-RFP-TaWRKY33-R	atccaggatcccggggcccTCAGTACTGGGAGTTCTTGGAAG	
p16318-eGFP-TaPUB23-F	gacgatatctctagaggatccATGGAGGGGACGTCGGTGGA	
p16318-eGFP-TaPUB23-R	gcccttgctcaccatggatccGCAAGGGTAATACGCCTTGA	
pGBKT7-TaPUB23-F	atggccatggaggccgaattcaccATGGAGGGGACGTCGGTGGA	酵母双杂分析 Yeast two-hybrid analysis
pGBKT7-TaPUB23-R	ccgctgcagggtcgacggatccTCAGCAAGGGTAATACGCCT	
pGADT7-TaDJA7-F	gccatggaggccagtgaattcaccATGCTCCACCCAGTGCACCG	
pGADT7-TaDJA7-R	atgcccacccgggtggaattcTCATCTCCTACTGTT	
nLUC-TaPUB23-F	gagaacacgggggacgagctcATGGAGGGGACGTCGGTG	LCA 分析 LCA analysis
nLUC-TaPUB23-R	cgcgtagagatctggctcgacGCAAGGGTAATACGCCTT	
cLUC-TaDJA7-F	tacgcgtcccggggcggtaccATGCTCCACCCAGTGCACCG	
cLUC-TaDJA7-R	acgaaagctctgcagggtcgacTCTCCTACTGTTTGCCGGCT	
pER8-TaPUB23-CeYFP-F	ctagtcgactctagcctcgagATGGAGGGGACGTCGGTGGA	BiFC 分析 BiFC analysis
pER8-TaPUB23-CeYFP-R	atcgtaggggtacatcctaggGCAAGGGTAATACGCCTTGA	
pER8-TaDJA7-NeYFP-F	tctgaggaggatcttctctaggATGCTCCACCCAGTGCACCG	
pER8-TaDJA7-NeYFP-R	gggaggcctggatcgactagtTCTCCTACTGTTTGCCGGCT	
pMBP-TaPUB23-F	tccgtgacaagcttgcgccgcATGGAGGGGACGTCGGTGGA	蛋白诱导和纯化 Protein induction and purification
pMBP-TaPUB23-R	tggtggtgctcgagtcggccgcTCAGCAAGGGTAATACGCCT	
pGEX-TaDJA7-F	ccgcgtggatccccggaattcATGCTCCACCCAGTGCACCG	
pGEX-TaDJA7-R	gatcgggccgctcgagtcgacTCTCCTACTGTTTGCCGGCT	

1.3 TaPUB23 基因的克隆

基于转录组中TaPUB23 基因序列,提交至中国春基因组数据库 (<http://urgi.versailles.inrae.fr/blast>)进行比对以获得TaPUB23 基因的全长序列。利用 SnapGene 6.0.2 设计全 ORF 区扩增引物。以小偃 6 号的 cDNA 为扩增模板,使用高保真酶扩增并通过胶回收纯化。将扩增产物通过无缝克隆连接到pEASY®-Blunt Zero Cloning 载体上,转化至大肠感受态 Trans 5α 中,37℃培养 1 d 后进行菌落 PCR 并测序提取质粒^[32]。

1.4 病毒诱导的基因过表达

将构建好的载体 BSMV:γ2-TaPUB23、γ2-PDS 及空载体 BSMV:α、BSMV:β、BSMV:γ1、BSMV:γ2 进行线性化。参照 Promega 体外转录试剂盒(美国,货号 P1320)说明书进行操作,按照对照组 BSMV:α+β+γ1+γ2;BSMV:α+β+γ1+γ2-PDS、试验组 BSMV:α+β+γ1+γ2-TaPUB23 的组合混合均匀,待小麦植株生长至三叶期,在第二叶上进行摩擦接种。待植株出现褪绿时接种条锈菌,接菌后的 0 和 48 h 采集小麦叶

片,进行 qRT-PCR 检测,以小麦*Ta26S* 作为内参基因,基因相对表达量参照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算。接菌后第 14 天采集条锈菌侵染小麦叶片表型,并拍照记录。

1.5 亚细胞定位

将构建的 p1302-eGFP-*TaPUB23* 和 p1302-eGFP 重组质粒分别转化至农杆菌 GV3101 感受态中,于 28 ℃、220 r·min⁻¹ 条件下过夜培养。离心后收集菌体,加入侵染液重悬 OD₆₀₀ 值至 0.6,28 ℃培育 1~2 h 后,将菌液混合后从烟草叶背面注入,注射 3~4 d 后观察荧光。小麦原生质体亚细胞定位试验参照酷莱搏小麦原生质体制备与转化试剂盒(北京,货号 PPT121)操作指南进行。

1.6 酵母双杂交系统筛选互作靶标

将 pGBKT7-*TaPUB23* 重组载体转入到酵母菌株 Y2HGold 中,验证 *TaPUB23* 的自激活活性与毒性。采用 Mating 法筛选 *TaPUB23* 的互作蛋白,具体试验参照 Clontech Matchmaker[®] Gold Yeast Two-Hybrid System(美国,货号 630489)说明书进行。设计引物扩增靶标基因全长并连接至 PGAD-T7 载体,进行 Y2H 互作验证。

1.7 互作验证

荧光素酶互补试验(LCA):将 pCambia1300-nLUC-*TaPUB23*、pCambia1300-cLUC-*TaDJA7* 及空白对照 pCambia1300-cLUC、pCambia1300-nLUC 转化至农杆菌感受态 GV3101 中,于 28 ℃、220 r·min⁻¹ 条件下过夜培养。离心后收集菌体,加入侵染液重悬 OD₆₀₀ 值至 0.6,28 ℃培育 1~2 h 后,注射至烟草体内,2~3 d 后利用多光谱动态荧光显微成像系统观察结果。

双分子荧光互补试验(BiFC):将 pER8-*TaPUB23*-CeYFP、pER8-*TaDJA7*-NeYFP 及空白对照 pER8-CeYFP、pER8-NeYFP 转化至农杆菌感受态 GV3101 中,于 28 ℃、220 r·min⁻¹ 条件下过夜培养。离心后收集菌体,加入侵染液重悬 OD₆₀₀ 值至 0.6,28 ℃培育 1~2 h 后,将菌液混合后注射烟草叶片背面。3~4 d 后将烟草叶片制成玻片,观察荧光情况。

Pull-down 互作验证:将 pMBP-*TaPUB23*、pGEX-*TaDJA7* 及空载体 MBP 转入大肠杆菌 BL21(DE3)中,添加 1 mmol·L⁻¹ IPTG 于 16 ℃诱导表达 12 h,以获得大量目的蛋白。将诱导后的蛋白与 MBP Resin(美国,货号 E8021V)共同孵育,通过蛋白免疫印迹(Western blot)进行

分析。

1.8 体外泛素化

将 pMBP-*TaPUB23* 和 pGEX-*TaDJA7* 融合蛋白进行纯化,pMBP-*TaPUB23* 融合蛋白使用 MBP 标签亲和层析法纯化,将 pMBP-*TaPUB23* 融合蛋白与 MBP 标签树脂相结合,使用含 10 mmol·L⁻¹ 麦芽糖的洗脱缓冲液洗脱目的蛋白;pGEX-*TaDJA7* 融合蛋白使用 GST 标签亲和层析法纯化,将 pGEX-*TaDJA7* 融合蛋白与 GST 标签树脂相结合,使用含 10 mmol·L⁻¹ 还原型谷胱甘肽的洗脱缓冲液洗脱目的蛋白。使用纯化后的蛋白进行体外泛素化实验,参照优碧生物体外泛素化试剂盒(长春,货号 UBK-982)配置底物泛素化反应体系(表 2),37 ℃反应 2 h 后进行 Western blot 分析^[33]。

表 2 底物泛素化体系
Table 2 Substrate ubiquitination system

组成 Constituent	体积 Volume/ μ L
10×反应缓冲液 10×reaction buffer	2
10×E1 酶 10×E1 enzyme	2
5×泛素 5×ubiquitin	4
10×Mg ²⁺ -ATP	2
20×E2 酶(UBE2D/UbcH5c) 20×E2 enzyme(UBE2D/UbcH5c)	1
<i>TaPUB23</i> -MBP	2
<i>TaDJA7</i> -GST	4
ddH ₂ O	3

2 结果与分析

2.1 *TaPUB23* 基因克隆与序列分析

以小偃 6 号叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,目标条带经电泳检测(图 1a)并结合测序结果发现,*TaPU23* 基因核苷酸序列长 1 451 bp,其完整的 CDS 序列为 1 272 bp,编码 423 个氨基酸,理论等电点为 7.54,分子量为 46.3 kD。UniProt (<https://www.uniprot.org/>)在线预测 *TaPUB23* 的 N 端有 1 个 U-Box 结构域(7~83 氨基酸),C 端有 3 个串联的 ARM 基序(198~403 氨基酸),表明*TaPUB23* 编码 1 个 U-Box 型 E3 泛素连接酶。使用 <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc/>在线预测 *TaPUB23* 可能定位于细胞质中。系统发育树结果表明,*TaPUB23* 与乌拉尔图小麦 *TuPUB23* 和硬粒小麦 *TdPUB23* 具有较近的亲缘关系(图 1b)。

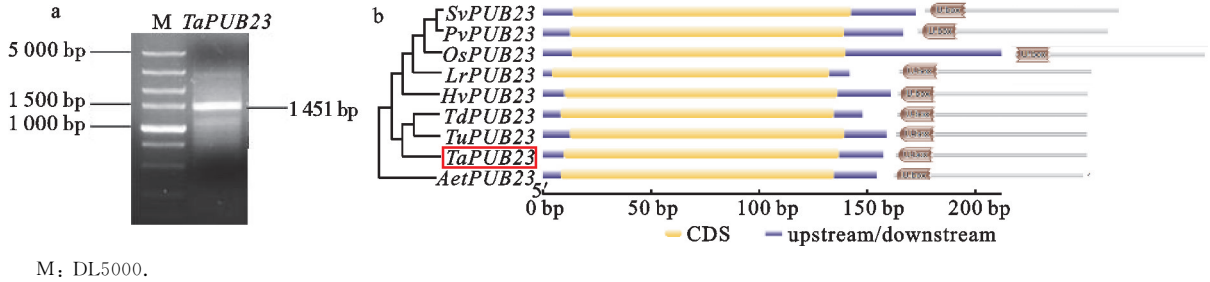


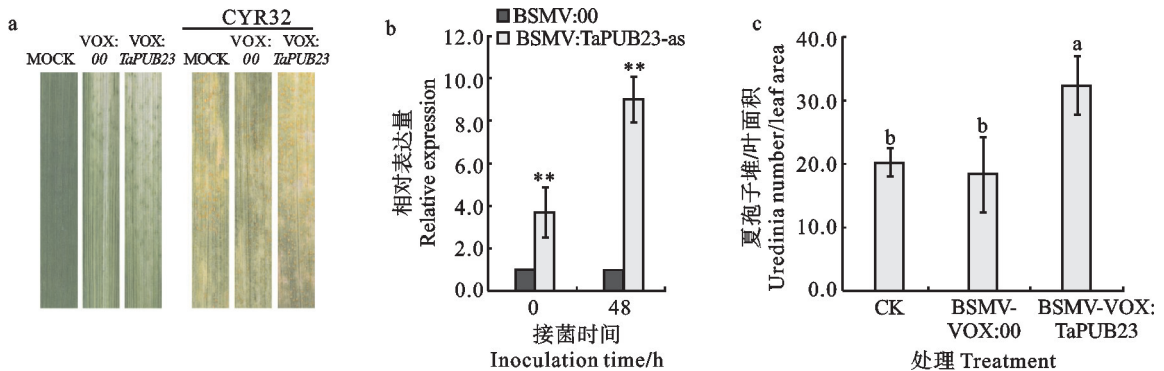
图 1 *TaPUB23* 基因的克隆(a)与系统发育树构建(b)
Fig. 1 Cloning of the *TaPUB23* gene(a) and construction of the phylogenetic tree(b)

2.2 *TaPUB23* 基因功能验证

采用大麦条纹花叶病毒(BSMV)介导的瞬时过表达系统过表达*TaPUB23* 基因。在接种病毒后的第 10 天,小麦品种小偃 6 号叶片出现条纹花叶症状(图 2a)。在第四叶接种条锈菌 CYR32 后的 0、48 h 检测*TaPUB23* 基因的表达效率,结果显示,*TaPUB23* 基因的表达量上调表达 2.71~7.99 倍(图 2b),表明过表达体系构建成功;在接菌后第 14 天,对照叶片和未过表达基因的叶片中夏孢子堆较少,叶片单位面积内夏孢子堆数平均为 20 和 18 个,而*TaPUB23* 基因过表达叶片上的孢子堆密集,单位面积内夏孢子堆数平均为 32 个,与对照存在显著差异(图 2c),并且出现夏孢子堆融合现象(图 2a),表明过表达*TaPUB23* 基因有利于条锈菌侵染小麦植株,*TaPUB23* 基因在小麦高温抗条锈性过程中起负向调控作用。

2.3 *TaPUB23* 亚细胞定位

为明确*TaPUB23* 基因在调控小偃 6 号高温抗锈性过程中发挥功能的位置,在烟草叶片中分别瞬时过表达 *TaPUB23*-GFP+*TaPIP2*-RFP 和 *TaPUB23*-GFP+*TaWRKY33*-RFP,在荧光显微镜下观察发现,*TaPUB23*-GFP 的绿色荧光和细胞膜 maker *TaPIP2*-RFP 的红色荧光在细胞膜上重合并融合成黄色荧光,和细胞核 maker *TaWRKY33*-RFP 的红色荧光在细胞核上重合并融合成黄色荧光,并且在细胞质中也可检测到绿色荧光(图 3a),表明 *TaPUB23* 定位于烟草细胞中的核质膜。利用 PEG 介导的转化法将 p16318GFP-*TaPUB23* 转至小麦原生质体,结果显示,p16318GFP-*TaPUB23* 产生的绿色荧光分布在细胞膜、细胞质及细胞核中,表明 *TaPUB23* 定位于小麦原生质体细胞中的核质膜(图 3b)。

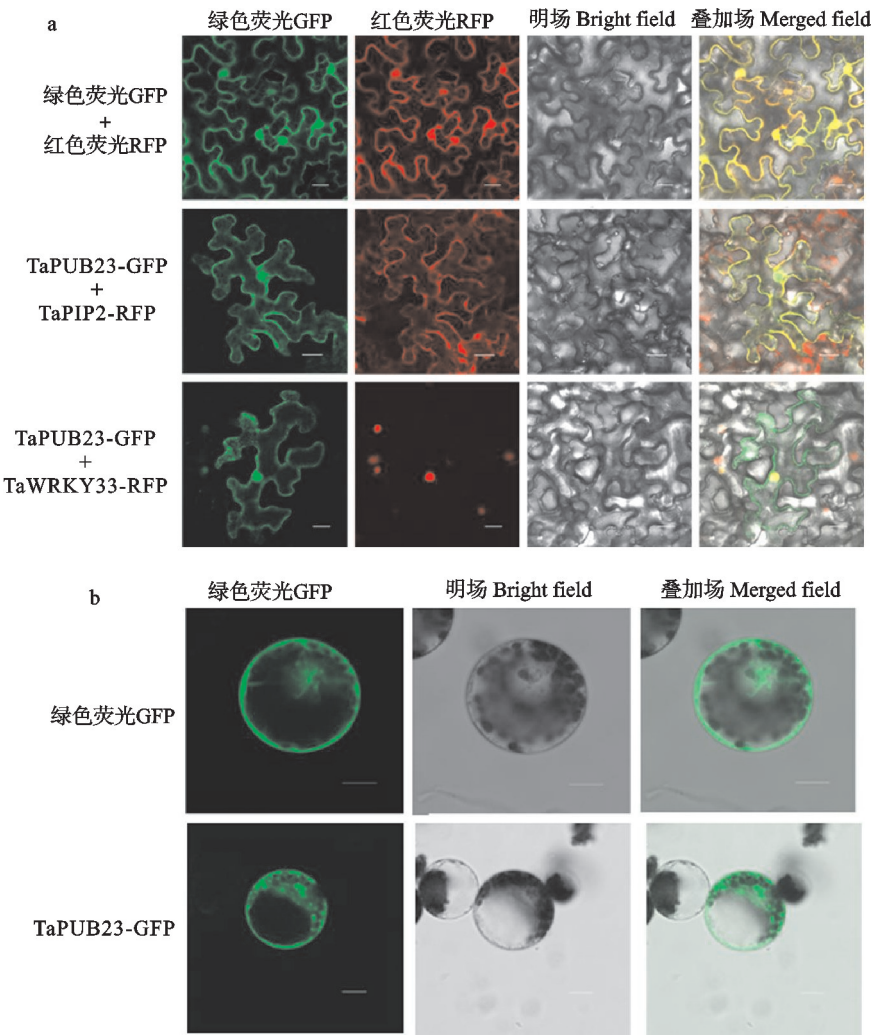


a: 小麦叶片接种病毒第 10 天表型及接种条锈菌第 14 天表型;b: *TaPUB23* 基因过表达效率检测; * *: $P < 0.01$; c: 小麦叶片接种条锈菌第 14 天夏孢子堆单位面积数量。图柱上的不同字母表示样本间差异在 0.05 水平上显著。

a: Phenotypes of wheat leaves inoculated with viruses for 10 days and with stripe rust for 14 days; b: Overexpression efficiency of *TaPUB23*; * *: $P < 0.01$; c: Number of uredinia per unit leaf area of wheat inoculated with stripe rust on the 14th day. Different letters above the columns indicate the significant differences among multiple groups of samples at 0.05 level.

图 2 BSMV 介导的*TaPUB23* 基因过表达

Fig. 2 Barley stripe mosaic virus(BSMV)-mediated gene overexpression of *TaPUB23*



a: TaPUB23 在烟草中的亚细胞定位,TaPIP2 为细胞膜 marker,TaWRKY33 为细胞核 marker,标尺为 50 μm ;b: TaPUB23 在小麦原生质体中的亚细胞定位,标尺为 20 μm 。

a: Subcellular localization of TaPUB23 in *N. benthamiana* , with TaPIP2 as a cell membrane marker, TaWRKY33 is a cell nucleus marker, bar=50 μm ; b: Subcellular localization of TaPUB23 in wheat protoplasts, bar=20 μm .

图 3 TaPUB23 的亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of TaPUB23

2.4 TaPUB23 互作靶标的筛选及验证

E3 泛素连接酶 TaPUB23 不存在自激活作用和毒性(图 4a),可与小麦 cDNA 文库中的 14 个候选基因编码的蛋白(表 3)发生互作,其中 *TaDJA7* 为互作靶标基因之一。已有研究表明, *TaDJA7* 在被磷酸化修饰后参与小偃 6 号高温抗锈性的分子调控^[14],但 TaPUB23 是否对 TaDJA7 进行泛素化修饰及其对小偃 6 号高温抗锈性的调控尚不明确,因此将 *TaDJA7* 确定为候选靶标基因。

克隆 *TaDJA7* 基因全长后连入 pGADT7 载体,将 pGBKT7-TaPUB23 重组诱饵载体与 pGADT7-DJA7 重组载体共转至酵母细胞中时,菌落在 SD/-Leu/-Trp/-His 缺陷型固体培养基

上可以正常生长且显蓝(图 4b);荧光素酶互补实验(LCA)和双分子荧光互补实验(BiFC)进一步验证了 TaPUB23 与 TaDJA7 在植物体内的直接互作(图 4c~图 4d);原核表达获得的 TaPUB23-MBP 和 TaDJA7-GST 重组蛋白进行 Pull-down 试验,进一步证实 TaPUB23 与 TaDJA7 在体外可直接互作(图 4e)。

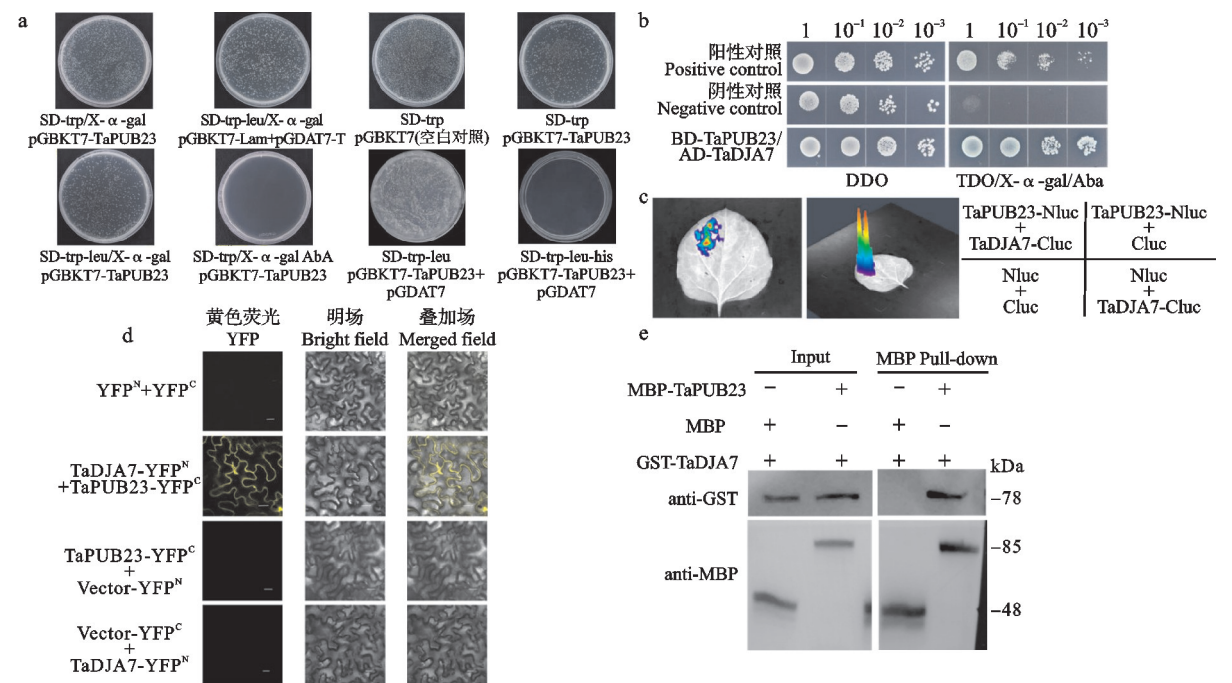
2.5 TaPUB23 泛素化 TaDJA7

Western blot 检测结果表明,在 E1、E2、Ubiquitin、TaPUB23-MBP(E3)蛋白及 TaDJA7-GST 蛋白均存在的情况下,可观察到 1 条弥散的拖带,而阴性对照无明显拖带(图 5),表明 TaPUB23-MBP 能够泛素化修饰底物 TaDJA7-GST,形成大分子(Ubi)n-TaDJA7-GST 复合物。

表 3 TaPUB23 筛库结果

Table 3 Candidate interactors of TaPUB23 from Y2H screening

基因号 Gene ID	基因注释 Gene annotation
LOC100127086	聚泛素 Polyubiquitin
LOC123052489	线粒体样 54S 核糖体蛋白 L24 54S ribosomal protein L24, mitochondrial-like
LOC123184685	未表征 Uncharacterized
LOC123054388	木葡聚糖内切转葡萄糖苷酶蛋白 13 Putative xyloglucan endotransglucosylase protein 13
LOC123151765	亚硫酸盐氧化酶 Sulfite oxidase-like
LOC123164414	聚泛素 Polyubiquitin
LOC100127086	聚泛素 Polyubiquitin
LOC123080888	阳离子过氧化物酶 SPC4 Cationic peroxidase SPC4-like
LOC109781346	聚泛素 Polyubiquitin
LOC123078420	小麦重金属相关异丙基化蛋白 Heavy metal-associated isoprenylated plant protein 20-like
LOC123102859	分子伴侣蛋白 DnaJ A7A Chaperone protein dnaJ A7A, chloroplastic-like
LOC123046348	聚泛素 Polyubiquitin
LOC123080472	未表征 Uncharacterized
LOC123138253	Rac 样 GTP 结合蛋白 3 Rac-like GTP-binding protein 3



a: TaPUB23 的自激活与毒性验证; b: 酵母双杂交一对一验证; c: LCA 验证 TaPUB23 与 TaDJA7 互作; d: BiFC 验证 TaPUB23 与 TaDJA7 互作; e: Pull-down 验证 TaPUB23 与 TaDJA7 互作。

a: Detection of self-activation and toxicity of TaPUB23; b: Yeast-two-hybrid one-to-one verification; c: Interaction between TaPUB23 and TaDJA7 was verified by LCA; d: Interaction between TaPUB23 and TaDJA7 was verified by BiFC; e: Interaction between TaPUB23 and TaDJA7 was verified By Pull-down.

图 4 TaPUB23 与 TaDJA7 互作验证

Fig. 4 Interaction between TaPUB23 and TaDJA7

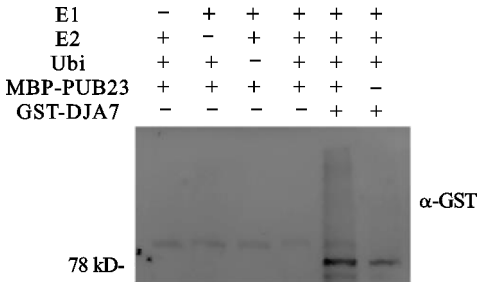


图 5 TaPUB23 泛素化底物 TaDJA7

Fig. 5 TaPUB23 ubiquitinates the substrate TaDJA7

3 讨论

植物病害的发生、发展到流行取决于病原菌、寄主植物和环境因素的综合作用。大量研究表明,植物在生长发育和病原菌侵染传播过程中易受到温度等环境因子的影响^[34-37]。温度作为最重要的环境因素之一,不仅影响病原菌本身的致病力,同时还调控宿主植物的抗性。许多植物中广

泛存在对病原菌的温度敏感抗性,如在水稻-稻瘟病菌系统中,暖温降低了茉莉酸 JA 调节的基础抗性,加剧水稻稻瘟病菌感染,施用茉莉酸甲酯 MeJA 则可提高暖温时对稻瘟病的抗性^[38]。有文献报道,*Pi54* 基因介导的稻瘟抗性具有显著的温度依赖性,在常温 25~28 °C 下携带 *Pi54* 基因的水稻品种对稻瘟病菌表现出强抗性,而在高温 32~35 °C 环境中,其抗性被显著抑制^[39]。在小麦与条锈菌协同进化过程中,一些寄主小麦在一定的温度范围内会对条锈菌产生抗性^[3]。转录组分析发现,共有 1 395 个差异基因参与调节小偃 6 号高温全生育期抗条锈性的过程^[14]。本研究针对其中 1 个在条锈菌及温度双重诱导下基因表达量显著上调的 E3 泛素连接酶基因 *TaPUB23* 开展了相关分析。E3 泛素连接酶在植物抗逆境胁迫中具有重要作用,*TaPIR1* 通过泛素化降解 *TaHRP1*,进而改变 *PhANGs* 的表达,从而负调控小麦对条锈病的抗性^[40]; *TaGW2* 通过介导转录因子 *TaARR12* 的降解,增强了小麦对于旱胁迫的抗性^[41]。本研究中,通过病毒介导的 *TaPUB23* 基因过表达显著降低了小偃 6 号的高温抗锈性,证实 *TaPUB23* 可能在温度波动条件下作为负调控因子介导小偃 6 号对条锈菌的抗性。

植物热休克蛋白(HSP70)家族在植物免疫中发挥着重要作用,包括调控蛋白质转运、翻译和降解^[42-43]。拟南芥中, *AtDJA3* 基因突变体表现出对外源脱落酸的敏感性增强,并且对盐和渗透胁迫的耐受性降低^[44]。水稻中, *OsDJA6* 直接与 E3 连接酶 *OsZFP1* 相互作用,利用泛素化蛋白酶体降解途径负调控水稻对稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)的免疫反应^[45]。本研究通过酵母双杂交系统筛选到 *TaPUB23* 的互作靶标 *TaDJA7*,利用 BiFC、LCA 和 Pull-down 试验验证了 *TaPUB23* 与 *TaDJA7* 的互作关系,且体外泛素化试验表明, *TaPUB23* 能够对 *TaDJA7* 进行泛素化修饰,推测 *TaPUB23* 可能通过泛素化降解 *TaDJA7*,进而负向调控小偃 6 号的高温抗锈性。然而,被泛素化修饰的 *TaDJA7* 是否影响下游某些蛋白质的转运、翻译和降解,从而调控小麦的高温抗锈性仍需进一步研究。

本研究初步解析了 E3 泛素连接酶基因 *TaPUB23* 的分子作用机制,为揭示小偃 6 号高温全生育期抗锈性的分子机理奠定了基础。未来研究应进一步解析 UPS 在小偃 6 号高温全生育期抗锈性中的

调控作用,深入揭示其抗锈性的分子机制,同时为抗病品种的培育提供重要的理论依据。

4 结论

根据转录组测序结果,筛选到一个小麦 E3 泛素连接酶基因 *TaPUB23*,利用烟草瞬时表达及小麦原生质体转化表明 *TaPUB23* 定位在细胞膜、细胞质及细胞核中,通过病毒介导的瞬时过表达发现其负向调控小麦高温全生育期抗锈性。选用酵母双杂交技术筛选到 *TaPUB23* 的互作靶标 *TaDJA7*,通过荧光素酶互补试验(LCA)、双分子荧光互补(BiFC)和 Pull-down 试验验证两者互作。体外泛素化试验表明 *TaPUB23* 能够泛素化修饰 *TaDJA7* 以调控小偃 6 号的高温全生育期抗锈性。

参考文献:

- [1]ALI S, GLADIEUX P, LECONTE M, et al. Origin, migration routes and worldwide population genetic structure of the wheat yellow rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(1): e1003903.
- [2]CHEN X M. Epidemiology and control of stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) on wheat [J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2005, 27(3): 314.
- [3]QAYOUM A, LINE R F. High-temperature adult plant resistance to stripe rust of wheat [J]. *Phytopathology*, 1985, 75(10): 1121.
- [4]LINE R F. Stripe rust of wheat and barley in North America: A retrospective historical review [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2002, 40: 114.
- [5]商鸿生. 小麦对条锈病的高温抗病性研究[J]. 中国农业科学, 1998, 31(4): 49.
SHANG H S. High temperature resistance of wheat to stripe rust [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1998, 31(4): 49.
- [6]LIN F, CHEN X M. Quantitative trait loci for non-race-specific, high-temperature adult-plant resistance to stripe rust in wheat cultivar express [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 118(4): 631.
- [7]王利国, 商鸿生, 井金学. 高温抗条锈性小麦品种的筛选和鉴定[J]. 西北农业学报, 1995, 4(1): 35.
WANG L G, SHANG H S, JING J X. Screening and identification of wheat varieties with high-temperature resistance to stripe rust [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 1995, 4(1): 35.
- [8]张悦. 中国小麦主产区 305 份品种抗条锈病评价及抗病基因分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022: 44.
ZHANG Y. Evaluation of stripe rust resistance and analysis of *Yr* genes in 305 wheat cultivars from the main wheat-growing regions in China [D]. Yangling: Northwest A&F University,

- 2022;44.
- [9]王保通,商鸿生.小麦高温抗条锈性表达与苯丙氨酸解氨酶和多酚氧化酶活性的关系[J].麦类作物学报,2001,21(3):42.
- WANG B T, SHANG H S. Relation between the high temperature resistance to stripe rust of wheat and phenylalanine ammonia lyase and polyphenol oxidase [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2001, 21(3): 42.
- [10]MA Q, SHANG H. Ultrastructural analysis of the interaction between *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* and wheat after thermal induction of resistance [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2004, 86(1): 19.
- [11]王保通,商鸿生.小麦高温抗条锈性的组织病理学和超微结构变化[J].植物保护学报,2003,30(2):119.
- WANG B T, SHANG H S. Histopathology and ultrastructure of wheat in expression of high-temperature resistance to stripe rust [J]. *Journal of Plant Protection*, 2003, 30(2): 119.
- [12]胡小平,王雅婷,商鸿生.小偃6号高温抗条锈病的表达规律[J].西北农业学报,2012,21(2):43.
- HU X P, WANG Y T, SHANG H S. Characteristics of expression of high-temperature resistance to stripe rust in Xiaoyan 6 [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2012, 21(2): 43.
- [13]安菲,陶飞,王军娟,等.小偃6号高温抗条锈性表达的最佳条件[J].麦类作物学报,2015,35(9):1314.
- AN F, TAO F, WANG J J, et al. Optimal conditions of expression of high-temperature resistance to stripe rust in Xiaoyan 6 [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2015, 35(9): 1314.
- [14]TAO F, WANG J J, GUO Z F, et al. Transcriptomic analysis reveal the molecular mechanisms of wheat higher-temperature seedling-plant resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 240.
- [15]陶飞.转录组分析小偃6号高温抗条锈病的互作机理及相关基因功能验证[D].杨凌:西北农林科技大学,2018:94.
- TAO F. Transcriptome analysis of the interaction mechanism of wheat high-temperature resistance to stripe rust in Xiaoyan 6 and functional characterization of related genes [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2018: 94.
- [16]SHI Y F, BAO X Y, SONG X P, et al. The leucine-rich repeat receptor-like kinase protein TaSERK1 positively regulates high-temperature seedling plant resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* by interacting with TaDJA7 [J]. *Phytopathology*, 2023, 113(7): 1325.
- [17]WANG J H, WANG J J, LI J, et al. The RLK protein TaCRK10 activates wheat high-temperature seedling-plant resistance to stripe rust through interacting with TaH2A.1 [J]. *The Plant Journal*, 2021, 108(5): 1241.
- [18]HU Y S, TAO F, SU C, et al. NBS-LRR gene TaRPS2 is positively associated with the high-temperature seedling plant resistance of wheat against *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [J]. *Phytopathology*, 2021, 111(8): 1449.
- [19]WANG J H, TIAN W, TAO F, et al. TaRPM1 positively regulates wheat high-temperature seedling-plant resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 10: 1679.
- [20]HU Y S, SU C, ZHANG Y, et al. A *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* effector inhibits high-temperature seedling-plant resistance in wheat [J]. *The Plant Journal*, 2022, 112(1): 249.
- [21]BAO X Y, HU Y S, LI Y X, et al. The interaction of two *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* effectors modulates high-temperature seedling-plant resistance in wheat [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2023, 24(12): 1522.
- [22]胡洋山.条锈菌效应蛋白响应小偃6号小麦高温抗病性的分子机制研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2022:98.
- HU Y S. Molecular mechanism of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* effectors in response to high-temperature resistance of wheat cv. Xiaoyan 6 [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2022: 98.
- [23]WANG J J, TAO F, TIAN W, et al. The wheat WRKY transcription factors TaWRKY49 and TaWRKY62 confer differential high-temperature seedling-plant resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0181963.
- [24]WANG J H, WANG J J, SHANG H S, et al. TaXa21, a leucine-rich repeat receptor-like kinase gene associated with TaWRKY76 and TaWRKY62, plays positive roles in wheat high-temperature seedling plant resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2019, 32(11): 1526.
- [25]郭忠峰,陶飞,田玮,等.小偃6号TaWRKY45基因在高温抗条锈病中的功能研究[J].麦类作物学报,2017,37(10):1318.
- GUO Z F, TAO F, TIAN W, et al. Functions of TaWRKY45 on the high-temperature resistance to stripe rust in Xiaoyan 6 [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2017, 37(10): 1318.
- [26]LANGIN G, GONZÁLEZ-FUENTE M, ÜSTÜN S. The plant ubiquitin-proteasome system as a target for microbial manipulation [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2023, 61(1): 351.
- [27]DREHER K, CALLIS J. Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants [J]. *Annals of Botany*, 2007, 99(5): 787.
- [28]SMALLE J, VIERSTRA R D. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 555.
- [29]LIU Z Q, QIU J H, SHEN Z N, et al. The E3 ubiquitin ligase OsRGLG5 targeted by the *Magnaporthe oryzae* effector AvrPi9 confers basal resistance against rice blast [J]. *Plant Communications*, 2023, 4(5): 100626.
- [30]MA A F, ZHANG D P, WANG G X, et al. *Verticillium dahliae* effector VDAL protects MYB6 from degradation by interacting with PUB25 and PUB26 E3 ligases to enhance *Verticillium* wilt resistance [J]. *The Plant Cell*, 2021, 33(12): 3675.

- [31]MOU B H,ZHAO G S,WANG J Y,*et al.* The OsCPK17-OsPUB12-OsRLCK176 module regulates immune homeostasis in rice [J]. *The Plant Cell*,2024,36(4):987.
- [32]包喜悦. 小偃 6 号高温抗条锈病基因TaRABH1bL 的克隆及功能分析 [D]. 杨凌:西北农林科技大学,2023:41.
BAO X Y. Cloning and functional analysis of TaRABH1bL gene involved in high temperature resistance to stripe rust of Xiaoyan 6 [D]. Yangling:Northwest A&F University,2023:41.
- [33]王金棉,韩璐昕,康振生,等. 小麦 E3 泛素连接酶 TaRING1 互作靶标筛选与验证[J]. 西北植物学报,2024,44(9):1411.
WANG J M,HAN L X,KANG Z S,*et al.* Screening and validation of interaction targets for wheat E3 ubiquitin ligase TaRING1 [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*,2024,44(9):1411.
- [34]VAN DIJK K,FOUTS D E,REHM A H,*et al.* The Avr (effector) proteins HrmA (HopPsyA) and AvrPto are secreted in culture from *Pseudomonas syringae* pathovars via the Hrp (type III) protein secretion system in a temperature- and pH-sensitive manner [J]. *Journal of Bacteriology*,1999,181(16):4790.
- [35]WEINGART H,STUBNER S,SCHENK A,*et al.* Impact of temperature on in planta expression of genes involved in synthesis of the *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*,2004,17(10):1095.
- [36]HASEGAWA H,CHATTERJEE A,CUI Y,*et al.* Elevated temperature enhances virulence of *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* strain EC153 to plants and stimulates production of the quorum sensing signal, N-acyl homoserine lactone, and extracellular proteins [J]. *Applied and Environmental Microbiology*,2005,71(8):4655.
- [37]FAN L L,YONG M L,LI D Y,*et al.* Effect of temperature on the development of sclerotia in *Villosiclava virens* [J]. *Journal of Integrative Agriculture*,2016,15(11):2550.
- [38]QIU J H,XIE J H,CHEN Y,*et al.* Warm temperature compromises JA-regulated basal resistance to enhance *Magnaporthe oryzae* infection in rice [J]. *Molecular Plant*,2022,15(4):723.
- [39]MADHUSUDHAN P,SINHA P,RAJPUT L S,*et al.* Effect of temperature on Pi54-mediated leaf blast resistance in rice [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*,2019,35(10):148.
- [40]ZHANG R R,WU Y,QU X R,*et al.* The RING-finger ubiquitin E3 ligase TaPIR1 targets TaHRP1 for degradation to suppress chloroplast function [J]. *Nature Communications*,2024,15(1):6905.
- [41]LI S M,ZHANG Y F,LIU Y L,*et al.* The E3 ligase TaGW2 mediates transcription factor TaARR12 degradation to promote drought resistance in wheat [J]. *The Plant Cell*,2024,36(3):605.
- [42]LIU J Z,WHITHAM S A. Overexpression of a soybean nuclear localized type-III DnaJ domain-containing HSP40 reveals its roles in cell death and disease resistance [J]. *The Plant Journal*,2013,74(1):110.
- [43]LIU Q L,LIANG C,ZHOU L. Structural and functional analysis of the Hsp70/Hsp40 chaperone system [J]. *Protein Science*,2020,29(2):378.
- [44]SALAS-MUNOZ S,RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ A A,ORTEGA-AMARO M A,*et al.* *Arabidopsis AtDjA3* null mutant shows increased sensitivity to abscisic acid, salt, and osmotic stress in germination and post-germination stages [J]. *Frontiers in Plant Science*,2016,7:220.
- [45]ZHONG X H,YANG J X,SHI Y L,*et al.* The DnaJ protein OsDjA6 negatively regulates rice innate immunity to the blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. *Molecular Plant Pathology*,2018,19(3):607.