

网络出版时间: 2026-05-25

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/61.1359.S.20260525.1045.016>

敲除*TaMAPK1* 部分同源基因对小麦苗期耐旱性的调控机制

杜迪迪, 吴保为, 龚悦, 马猛, 刘香利, 赵惠贤

(西北农林科技大学生命科学学院, 陕西杨陵 712100)

摘要: 为解析小麦丝裂原活化蛋白激酶基因*TaMAPK1-6A*、*TaMAPK1-6B*和*TaMAPK1-6D*在苗期耐旱性中的功能及其同源基因之间的叠加效应, 以春小麦品种 Fielder 及其为遗传背景通过 CRISPR/Cas9 介导的小麦基因组编辑技术创制的*TaMAPK1* 单基因突变体*mapk1-aa*、*mapk1-bb*和*mapk1-dd*(简称单突变体)为供试材料, 通过杂交、自交及其后代分离群体的基因型检测, 创制了双基因敲除突变体和三基因敲除纯合突变体(分别简称双突变体和三突变体), 并对这些单突变体、双突变体和三突变体以及对照(野生型 Fielder)苗期耐旱性进行了系统评价。结果表明, *TaMAPK1* 单基因功能缺失突变导致小麦幼苗耐旱性显著降低, 表现为叶片保水能力下降、渗透调节物质积累减少和膜脂过氧化加剧。双突变体和三突变体的耐旱性较单突变体进一步降低, 生理生化指标恶化程度随突变基因拷贝数增加而加剧。综上, *TaMAPK1* 基因正调控小麦苗期耐旱性, 其同源基因具有累加调控作用。

关键词: 小麦; *TaMAPK1*; 耐旱性; 基因编辑; 同源基因; 叠加效应

中图分类号: S512.1; S330

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2026)08-0991-09

Regulatory Mechanism Underlying Drought Tolerance in Wheat Seedlings via *TaMAPK1* Partial Homeologous Genes Knockout

Du Didi, Wu Baowei, Gong Yue, Ma Meng, Liu Xiangli, Zhao Huixian

(College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: To elucidate the functions of the wheat mitogen-activated protein kinase genes *TaMAPK1-6A*, *TaMAPK1-6B*, and *TaMAPK1-6D* in seedling drought tolerance and the additive effects among these homeologous genes, this study utilized the spring wheat cultivar Fielder and its CRISPR/Cas9 mediated single-gene mutants-*mapk1-aa*, *mapk1-bb*, and *mapk1-dd*-generated in the Fielder genetic background. Through hybridization, self-pollination, and genotyping of segregating progeny, double-gene knockout mutants and triple-gene knockout homozygous mutants(hereafter referred to as double and triple mutants) were successfully developed. The drought tolerance at the seedling stage was systematically evaluated for these single, double, and triple mutants, along with the wild-type Fielder control. The results demonstrated that loss-of-function mutations in single *TaMAPK1* genes significantly reduced drought tolerance in wheat seedlings, manifested as decreased leaf water retention, reduced accumulation of osmotic adjustment substances, and enhanced membrane lipid peroxidation. Further investigation revealed that drought tolerance was further impaired in double and triple mutants, with the deterioration of physiological and biochemical indicators intensifying as the number of mutated gene copies increased. In summary, the *TaMAPK1* gene positively regulates drought tolerance at the wheat seedling stage, and its homeologous genes exhibit cumulative regulatory effects.

收稿日期: 2026-01-14

修回日期: 2026-02-03

基金项目: 陕西省重点研发项目(2025NC-YBXM-002); 国家自然科学基金项目(32372103 和 32072003); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2024JC-YBMS-171)

第一作者 E-mail: d13598191961@163.com(杜迪迪)

通讯作者 E-mail: hxzhao212@163.com(赵惠贤)

Keywords: Wheat; *TaMAPK1*; Drought tolerance; Gene editing; Homoeologs; Additive effect

普通小麦(*Triticum aestivum* L.)是中国主要的粮食作物之一,其产量和品质常受到干旱胁迫的严重影响^[1]。挖掘小麦耐旱关键基因、解析其调控机制,对于培育抗旱节水型小麦品种、保障国家粮食安全具有重要意义。由于普通小麦多倍体基因组结构,大多数基因以3个同源拷贝的形式存在,分别来源于A、B和D亚基因组。这种结构带来了功能冗余的挑战即单个同源基因的突变效应可能会被其他拷贝补偿,但也为精细的功能分化和剂量调控提供了进化空间^[2]。确定多个基因拷贝是以完全冗余、加性效应还是功能分化的方式发挥作用,是理解小麦复杂性状遗传基础的关键。

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)是存在于真核生物中的保守信号枢纽,在整合环境信号、调控生长发育以及胁迫响应过程中发挥核心作用。该通路通过级联磷酸化传递胁迫信号,调控下游抗逆相关基因表达及相关的生理代谢,从而影响植物对干旱、高盐、低温等逆境的适应能力^[3]。前期已在六倍体小麦中鉴定出位于6A、6B和6D染色体上的3个*TaMAPK1*同源基因,分别命名为*TaMAPK1-6A*、*TaMAPK1-6B*和*TaMAPK1-6D*^[4]。研究表明,过表达*TaMAPK1-6A*能够增强小麦幼苗耐旱性^[5]。然而,这3个同源基因在增强小麦抗旱性中的协同作用方式目前尚不清楚。

课题组前期研究采用CRISPR/Cas9介导的小麦基因组编辑技术创制得到*TaMAPK1-6A*、*TaMAPK1-6B*和*TaMAPK1-6D*单基因敲除纯合突变体(简称单突变体)^[6]。本研究以这3个单突变体为供试材料,通过连续杂交、自交及其后代分离群体的分子标记检测,成功创制了双基因敲除突变体和三基因敲除纯合突变体(分别简称双突变体和三突变体),并对这些单突变体、双突变体和三突变体以及对照(野生型Fielder小麦)苗期耐旱性进行了系统评价,旨在阐明*TaMAPK1*的3个同源基因在增强小麦幼苗耐旱性过程中的协同作用方式,为小麦抗旱分子育种提供新的基因资源与理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料包括春小麦品种Fielder以及在Fielder遗传背景下的*TaMAPK1-6A*、*TaMAPK1-6B*和*TaMAPK1-6D*的单基因突变体(*mapk1-aa*、

*mapk1-bb*和*mapk1-dd*)(由本课题组实验室吴保为博士创制)。

1.2 小麦基因组DNA的提取

采集野生型Fielder小麦和基因型待鉴定的小麦突变体*mapk1*杂交/自交分离后代幼苗期叶片,通过CTAB法提取基因组DNA^[7]。

1.3 *TaMAPK1*双突变体和三突变体的创制

为获得小麦*TaMAPK1*双突变体材料,本研究分别利用单突变体*mapk1-aa*、*mapk1-bb*和*mapk1-dd*进行两两杂交,得到分别携带*TaMAPK1-A/B*和*TaMAPK1-A/D*同源基因等位突变的F₁代杂合植株(基因型为*TaMAPK1-AaBbDD*和*TaMAPK1-AaBbDd*);采用之前建立的*TaMAPK1-6A/mapk1-a*、*TaMAPK1-6B/mapk1-b*及*TaMAPK1-6D/mapk1-d*等位基因特异PCR(AS-PCR)标记方法^[6],对杂合株自交后代群体中的个体进行基因型鉴定,筛选出*TaMAPK1-6A/6B*与*TaMAPK1-6A/6D*的双突变体。

以上述获得的*TaMAPK1-6A/6B*双突变体为母本,与*TaMAPK1-6A/6D*双突变体进行杂交,获得同时携带3个同源基因等位突变的F₁代杂合植株(基因型为*TaMAPK1-aaBbDd*);再用*TaMAPK1-6B/mapk1-b*及*TaMAPK1-6D/mapk1-d*的AS-PCR标记方法^[6],对杂合株自交后代群体进行基因型鉴定,筛选出*TaMAPK1-6A/6B/6D*纯合三突变体。

根据前期Hi-TOM测序获得的*TaMAPK1*的各突变基因序列,*TaMAPK1-6A/6B/6D*的基因序列中,*TaMAPK1-6A*在sgRNA1处发生28 bp缺失,*TaMAPK1-6B*在sgRNA1处发生了5 bp缺失,*TaMAPK1-6D*在sgRNA1处发生了28 bp缺失(图1A)。

TaMAPK1-6A/mapk1-a、*TaMAPK1-6B/mapk1-b*及*TaMAPK1-6D/mapk1-d*的AS-PCR反应体系均为10 μL,包括DNA模板1 μL、2×Rapid Taq Master Mix 5 μL、上下游引物各0.3 μL。PCR反应程序:95℃ 3 min;95℃ 15 s,A-62℃/B-62.5℃/D-58℃ 15 s,72℃ 15 s,35个循环;72℃ 5 min,16℃ 1 min。其中,DNA模板为杂交或自交后代个体的基因组DNA(稀释20倍),上下游引物序列及用途见表1。AS-PCR产物采用3%的琼脂糖凝胶电泳(90 V,1~1.5 h)进行分离,在

凝胶成像仪下(君意,北京)进行观察和拍照。

1.4 小麦苗期耐旱性评价

挑选不同基因型小麦的饱满种子,清水浸泡过夜;将露白的种子均匀平铺于培养皿室温萌发后,选取发芽相对一致的幼苗移栽至装有 2.3 kg 培养土(基质土与沙按照 2:1 混合)的小花盆(31.0 cm×24.0 cm×9.0 cm)中,每个基因型材料种 2 行,每行 15 株,共设置 3 个生物学重复。于光照 16 h/8 h(白天/黑夜)、温度 14~20 ℃、湿度 45%~50%的温室中培养。正常供水培养至二叶一心期后,停止浇水,开始进行干旱处理,实时监测培养盆中土壤相对湿度(R_i)。参考文献[8]方法,计算本试验所用土壤的最大持水量(F_c)以及干旱

处理过程中的土壤相对湿度(R_i): $F_c = (W_o - W_D)/W_D$, $R_i = W_w/F_c \times 100\%$, $W_w = (W_T - W_D)/W_D$ [8]。 W_o 为吸水饱和土重, W_T 为实时土重, W_D 为烘干土重。

在干旱处理过程中,根据干旱评估标准($R_i \geq 60\%$ 为正常, $50\% \leq R_i < 60\%$ 为轻度干旱, $40\% \leq R_i < 50\%$ 为中度干旱, $30\% \leq R_i < 40\%$ 为重度干旱, $R_i < 30\%$ 为极重度干旱),通过花盆培养土的 R_i 判断土壤干旱程度。待土壤达到极重度干旱状态时,恢复正常供水,统计不同基因型小麦幼苗的存活率。前期预试验摸索确定在 R_i 约为 10% 时(分别断水至 9 和 12 d 时)恢复供水。试验重复 3 次,每次 3 个生物学重复。

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in this study

名称 Name	序列 Sequence	用途 Usage
mapk1-A-detec-F	CAAGTATGTGCCTATCAAACCCATA	mapk1-aa 突变检测 Mutation detection of mapk1-aa
mapk1-A-detec-R	GGAAGAGTGACGAAAAGGTGTA	
mapk1-D-detec-F	GTATGTGCCTATCAAGCCCATT	mapk1-dd 突变检测 Mutation detection of mapk1-dd
mapk1-D-detec-R	TGCGAATATAAGAATGGGTAGTGTAC	
mapk1-m20-WT-F	ATGCCTGTACAAAGGAGGAGC	mapk1-bb 突变检测 Mutation detection of mapk1-bb
mapk1-m20-B-R	AGTACCATCCTTGATGAATACTAGAGTGAA	

1.5 耐旱性试验生理生化指标测定

参考 Du 等[9]的方法,取不同基因型小麦二叶一心期生长相对一致的叶片进行离体叶片相对失水率(RWL)测定, $RWL = (\text{叶片鲜重} - \text{失水后重}) / \text{叶片鲜重} \times 100\%$ 。干旱处理 0、9 和 12 d 后(土壤相对湿度为 10%左右)采集小麦叶片,测定各生理生化指标。参照 Lu 等[10]的方法测定叶片相对含水量(RWC),参照 Shi 等[11]的方法测定叶片电导率(EL)。

叶片可溶性糖含量用考蕙酮比色法[12]测定;脯氨酸含量参照 Bates 等[13]方法测定; H_2O_2 含量测定参考 Sergiev 等的方法[14];丙二醛(MDA)含量采用硫代巴比妥酸法测定[15]。

1.6 数据分析

数据通过 Excel 整理后,用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行单因素方差分析,用 Duncan 多重比较检验不同组别之间的差异显著性($\alpha = 0.05$),用 GraphPad Prism8.0 作图。

2 结果与分析

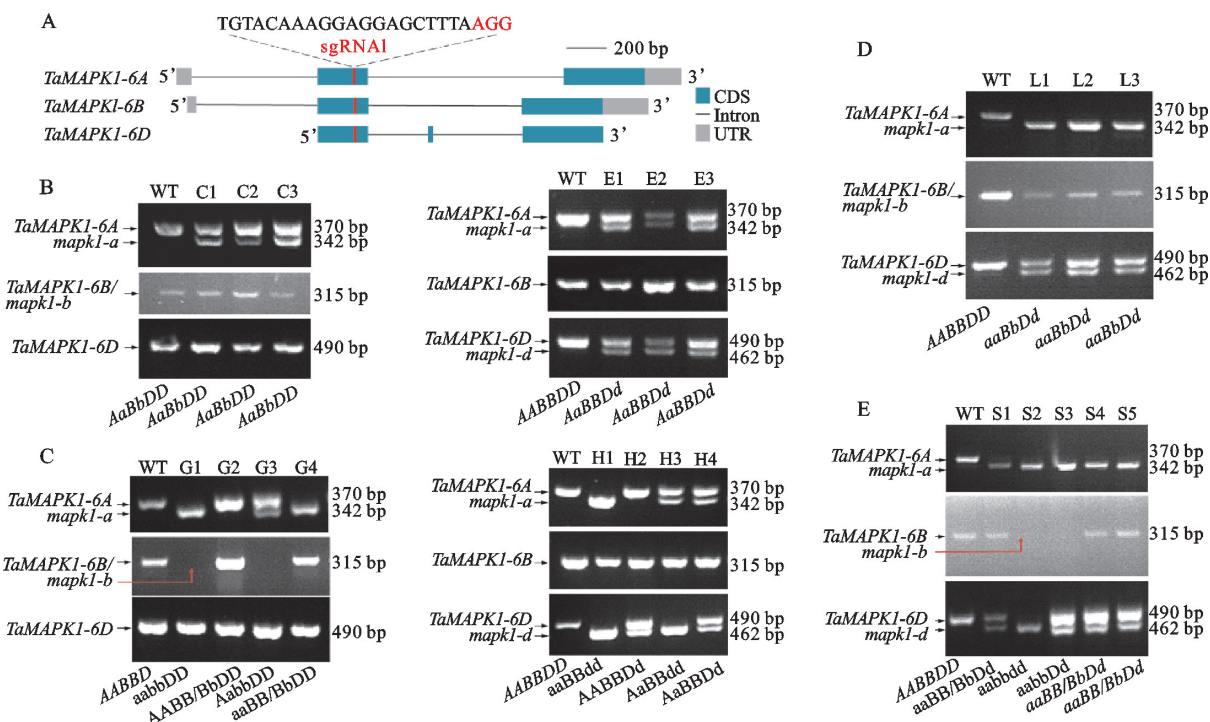
2.1 *TaMAPK1* 双突变体和三突变体的创制与鉴定

AS-PCR 扩增 *TaMAPK1-6A*、*mapk1-a* (*TaMAPK1-6A*^{-28 bp})、*TaMAPK1-6D* 和 *mapk1-d* (*TaMAPK1-6D*^{-28 bp}) 的条带大小分别为 370、342、490 和 462 bp,用 3% 琼脂糖凝胶电泳分离。*TaMAPK1-6B* 与 *mapk1-b* 相差 5 bp,特异性引物扩增时,若存在 *TaMAPK1-6B* 序列,均可扩增出单一明亮的条带(315 bp),而突变 *mapk1-b* (*TaMAPK1-6B*^{-5 bp}) 条带则扩增不出。

本研究利用单突变体 *mapk1-aa*、*mapk1-bb* 和 *mapk1-dd* 进行两两杂交,对杂交 F_1 代植株的基因型进行鉴定,获得基因型为 *TaMAPK1-AaBbDD* 和 *TaMAPK1-AaBBDD* 的 F_1 代杂合株(图 1A、图 1B),接着对杂合 F_1 代的自交分离株系进行基因型鉴定,筛选得到 *TaMAPK1-6A/6B* 与 *TaMAPK1-6A/6D* 的双突变体(基因型分别为 *TaMAPK1-aabbDD* 和 *TaMAPK1-aaBBdd*)(图 1C)。

对获得的双突变体 *TaMAPK1-aabbDD* 和 *TaMAPK1-aaBBdd* 进行杂交,鉴定得到基因型为 *TaMAPK1-aaBbDd* 的 F_1 代杂合株系(图 1D),接

着对 F_1 代的自交分离后代株系进行基因型鉴定,筛选得到 *TaMAPK1-6A/6B/6D* 三突变体(基因型为 *TaMAPK1-aabbdd*)(图 1E)。



A: *TaMAPK1-6A/6B/6D* 三个部分同源基因序列。红色框代表发生编辑的 sgRNA1 位点。B~E: 基因型鉴定, WT 为野生型对照 (*TaMAPK1-AABBDD*), C1~C3, E1~E3 为 *TaMAPK1-aaBBDD*、*-AAbbDD*、*-AABBdd* 单突变体杂交 F_1 代小麦部分株系, G1~G4, H1~H4 为 F_1 代杂合小麦自交分离后代部分株系, L1~L3 为 *TaMAPK1-aabbDD*、*-aaBBdd* 双突变体小麦杂交 F_1 代部分株系, S1~S5 为 *TaMAPK1-aaBbDd* 杂合小麦自交分离后代部分株系。

A: Sequences of the three homeologous genes *TaMAPK1-6A*, *-6B*, and *-6D*. The sgRNA1 site where editing occurred is highlighted in red. B~E: Genotyping identification, WT is wild-type control (*TaMAPK1-AABBDD*), C1~C3 and E1~E3 for selected F_1 lines from crosses among the single mutants *TaMAPK1-aaBBDD*, *-AAbbDD*, and *-AABBdd*, G1~G4 and H1~H4 for selected self-pollinated progeny from the F_1 heterozygous lines, L1~L3 for selected F_1 lines from a cross between *TaMAPK1-aabbDD* and *-aaBBdd* double mutants, S1~S5 for selected self-pollinated progeny from the heterozygous *TaMAPK1-aaBbDd* lines.

图 1 小麦 *TaMAPK1* 基因功能缺失突变体的鉴定

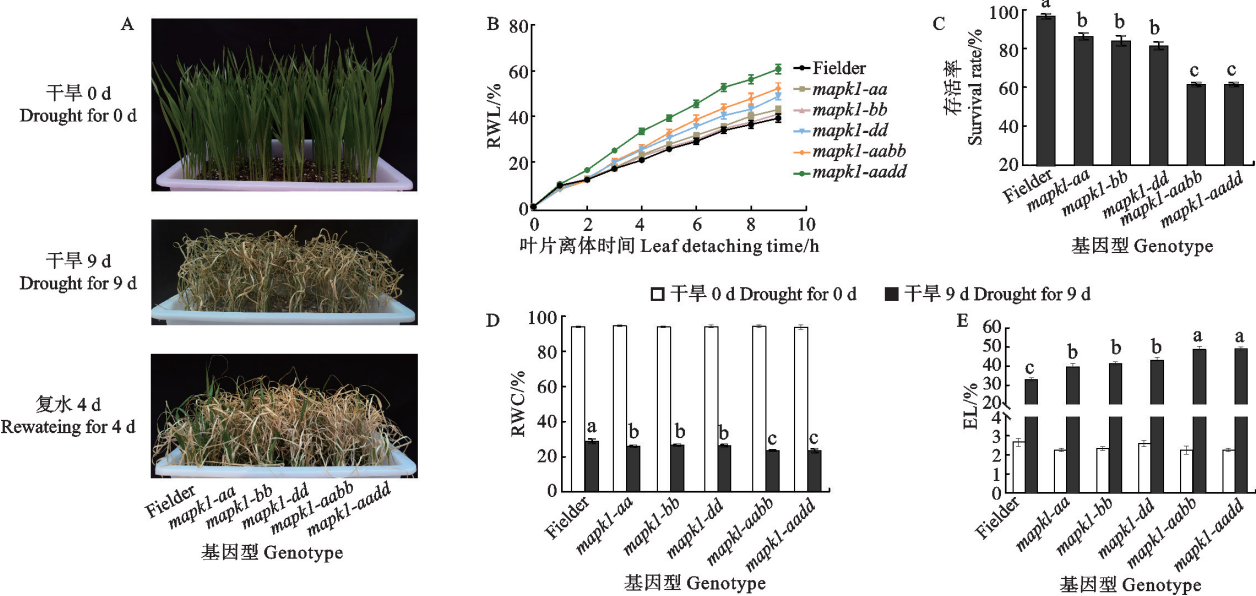
Fig. 1 Identification of loss-of-function mutants of *TaMAPK1* in wheat

2.2 小麦 *TaMAPK1* 单、双基因功能缺失突变体抗旱性的差异

干旱胁迫 9 d 后,野生型、*TaMAPK1* 单、双基因功能缺失突变体幼苗生长均受到影响,植株均出现不同程度萎蔫。与野生型相比, *mapk1* 基因功能缺失突变降低了小麦的抗旱性,复水 4 d 后 *mapk1* 突变体恢复生长的状态更差(图 2A)。

正常供水条件下, *mapk1* 突变体的细胞膜相对透性、叶片相对含水量(RWC)与野生型 Fielder 均无显著差异。相较于野生型 Fielder, *mapk1* 突变体的离体叶片失水率(RWL)明显增大。在干旱胁迫第 9 天,与野生型 Fielder 相比, *mapk1* 突变体的电导率(EL)增大 20.0%~49.0%, RWC 降低

8.1%~19.0%,复水 4 d 后的植株存活率降低 10.7%~36.4%(图 2B~图 2E)。进一步分析发现, *mapk1-aabb*、*mapk1-aadd* 双突变体的 RWL 明显高于 *mapk1-aa*、*mapk1-bb*、*mapk1-dd* 单突变体(图 2B)。与 *mapk1-aa*、*mapk1-bb* 单突变体相比, *mapk1-aabb* 双突变体的 EL 分别增大 23.0%和 18.3%, RWC 分别降低 9.0%和 11.2%,存活率分别降低 28.7%和 26.9%;与 *mapk1-aa*、*mapk1-dd* 单突变体相比, *mapk1-aadd* 双突变体的 EL 分别增大 24.2%和 14.2%, RWC 分别降低 9.6%和 11.1%,存活率分别降低 28.7%和 24.5%(图 2C~图 2E)。以上结果均表明 *TaMAPK1* 基因功能缺失突变导致小麦幼苗的保水能力更差,对干旱更加敏感。



图柱上不同字母表示同一处理不同基因型间差异显著($P<0.05$)。下同。
Different letters above the bars indicate significant differences among genotypes under the same treatmentt at 0.05 level($P<0.05$). The same in figures 3 and 4.

图 2 *TaMAPK1* 基因敲除对小麦耐旱性的影响
Fig. 2 Effects of *TaMAPK1* knockout on drought tolerance in wheat

2.3 *TaMAPK1* 基因功能缺失对小麦渗透调节与氧化应激响应的影响

TaMAPK1 基因功能缺失对小麦幼苗渗透调节物质和活性氧含量有显著影响。正常供水条件下, *mapk1* 突变体小麦幼苗叶片的可溶性糖、脯氨酸、 H_2O_2 和 MDA 含量与野生型均无显著差异(图 3A~图 3D)。在干旱胁迫第 9 天时, 相比于野生型 Fielder, *mapk1* 突变体的可溶性糖和脯氨酸含量分别降低 6.3%~13.7%和 6.0%~12.5%, 叶片 H_2O_2 和 MDA 含量分别增加 18.2%~39.0%和 18.9%~49.5%。与 *mapk1-aa*、*mapk1-bb* 单突变体相比, *mapk1-aabb* 双突变体的可溶性糖含量分别降低 7.5%和 7.4%, 脯氨酸含量分别降低 6.9%和 5.5%, H_2O_2 含量分别增大 16.9%和 15.7%, MDA 含量分别提高 17.1%和 24.3%; 与 *mapk1-aa*、*mapk1-dd* 单突变体相比, *mapk1-aadd* 双突变体的可溶性糖含量分别降低 7.8%和 7.9%, 脯氨酸含量分别降低 5.4%和 5.0%, H_2O_2 分别增大 17.5%和 15.8%, MDA 含量分别提高 18.4%和 20.2%(图 3A~图 3D)。这表明, 相较于野生型 Fielder, 干旱胁迫后 *mapk1* 突变体的体内渗透调节和活性氧清除能力降低, 不利于小麦在营养生长期抵御干旱胁迫。

2.4 *TaMAPK1* 三突变体较双突变体耐旱性比较

在干旱 12 d 和复水 7 d 后, *mapk1* 突变体恢复生长的状态明显差于野生型 Fielder, 其中

mapk1-aabbdd 纯合突变体恢复状态最差(图 4A)。从生理生化测定结果看, *mapk1-aabbdd* 纯合突变体的 RWL 最高, 叶片离体 8 h 后达到 66.8%, *mapk1-aabb* 和 *mapk1-aadd* 双突变体次之(45.3%、62.4%), 野生型最低(39.5%)(图 4B)。正常供水条件下, *mapk1* 突变体的 RWC 和 EL、可溶性糖含量、脯氨酸含量、 H_2O_2 含量及 MDA 含量均与野生型 Fielder 无显著性差异(图 4C~图 4D)。

干旱胁迫 12 d 后, *mapk1-aabbdd* 纯合突变体的叶片 RWC 最低(21.2%), EL 最大(52.3%); 复水 7 d 后 *mapk1-aabbdd* 纯合突变体的存活率最低(57.8%), 叶片的可溶性糖和脯氨酸含量均最低, 叶片 H_2O_2 和 MDA 含量均最高(图 4C~图 4I)。

与 *mapk1-aabb*、*mapk1-aadd* 双突变体相比, *mapk1-aabbdd* 纯合突变体的叶片 RWC 分别降低 12.2%、4.8%, EL 分别增大 11.0%和 12.1%, 复水 7 d 后的植株存活率分别降低 25.7%和 27.8%, 叶片可溶性糖含量分别降低 8.9%和 7.2%, 脯氨酸含量分别降低 10.2%和 5.8%, 叶片 H_2O_2 含量分别增加 22.4%和 18.5%, MDA 含量分别提高 39.0%和 32.8%。

这进一步表明, *TaMAPK1* 基因功能缺失突变后小麦叶片的保水能力下降, 植株渗透调节和活性氧清除能力降低, 对于干旱更加敏感, 且 *mapk1-aabbdd* 纯合突变体对干旱的敏感程度较 *mapk1-aabb*、*mapk1-aadd* 双突变体进一步增强。

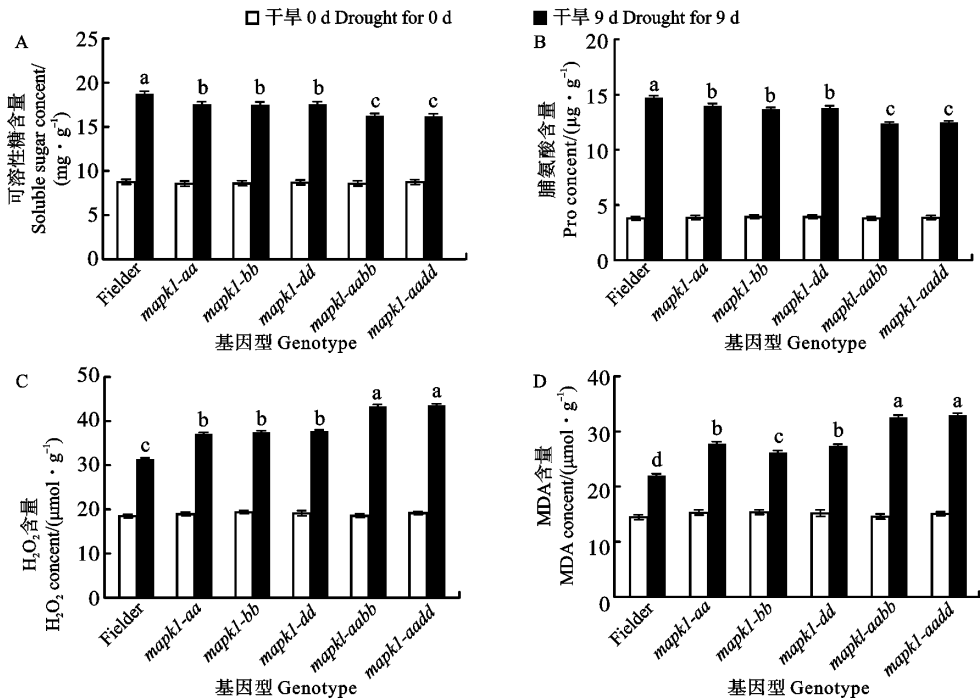


图 3 小麦 *mapk1* 单、双突变体干旱胁迫前后生化指标的比较

Fig. 3 Comparison of biochemical indices among *mapk1* single and double mutants before and after drought stress

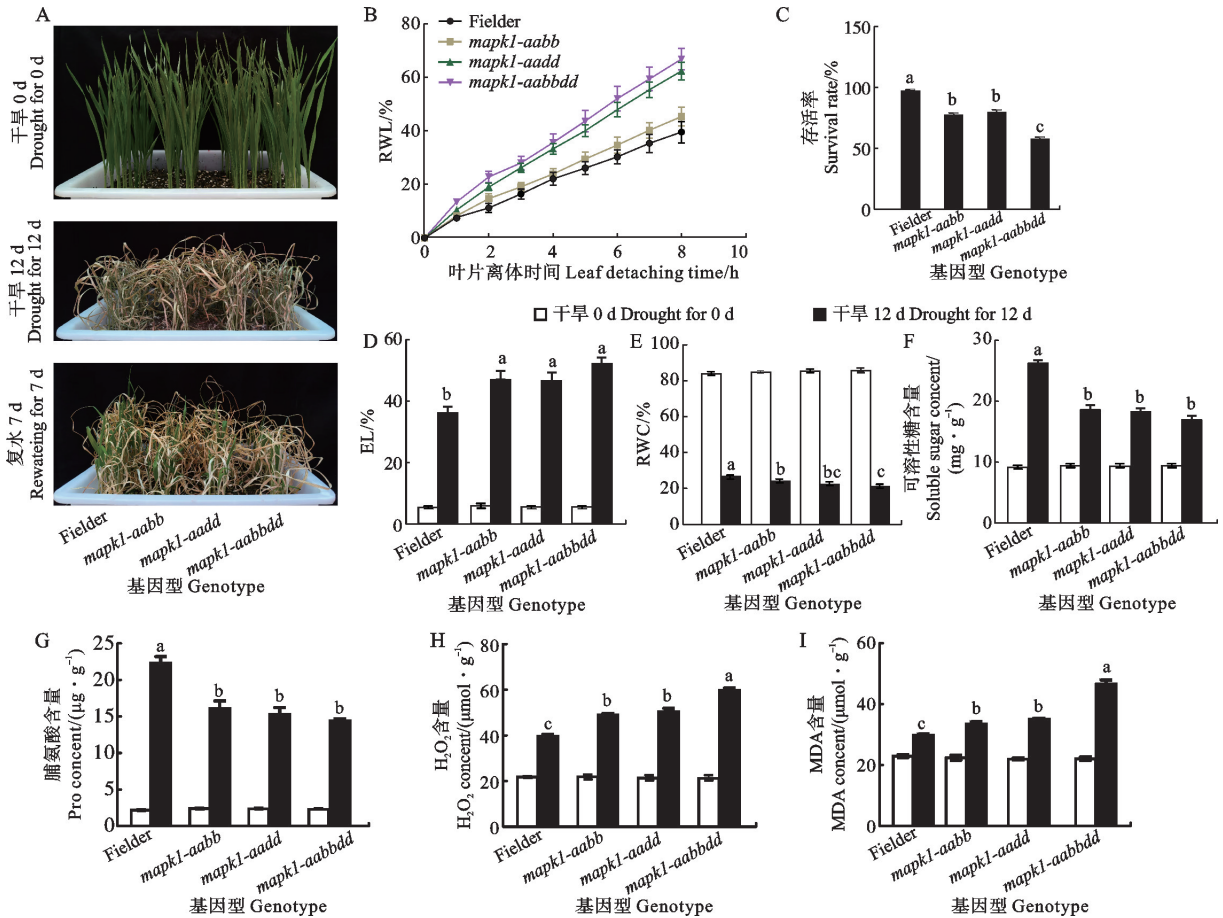


图 4 小麦 *mapk1* 双突变体和三突变体在干旱胁迫前后生理生化指标的比较

Fig. 4 Comparison of physiological and biochemical indices among *mapk1* double and triple mutants before and after drought stress

3 讨论

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术成功创制了 *TaMAPK1* 功能缺失突变体系列,包括单突变体 (*mapk1-aa*、*mapk1-bb*、*mapk1-dd*)、双突变体 (*mapk1-aabb*、*mapk1-aadd*) 以及纯合三突变体 (*mapk1-aabdd*),并系统评价了其在苗期干旱胁迫下的生理生化响应。结果表明,*TaMAPK1* 基因功能缺失导致小麦耐旱性显著降低,表现为叶片保水能力减弱、渗透调节物质积累不足、膜脂过氧化加剧以及活性氧清除能力下降,且这些负面效应在双突变体及三突变体中进一步加剧,证实了 *TaMAPK1-6A*、*TaMAPK1-6B* 和 *TaMAPK1-6D* 三个同源基因在抗旱性中具有明显的功能累加效应。

3.1 *TaMAPK1* 通过调控渗透平衡与氧化稳态增强小麦耐旱性

渗透调节物质(可溶性糖、脯氨酸)的积累是植物应对干旱胁迫的重要机制,其含量与作物的耐旱性呈正相关^[16-18]。本研究结果显示,在干旱胁迫后 *mapk1* 突变体的渗透调节物质(可溶性糖、脯氨酸)含量显著低于野生型,其抗旱性较野生型显著降低。此外,突变体中 MDA 和 H_2O_2 的含量显著增大^[14-15],*TaMAPK1* 基因功能缺失导致活性氧清除系统受损,使细胞膜完整性遭到破坏。已有研究表明,MAPK 通路可通过激活抗氧化酶系统(如 SOD、CAT、POD)来减轻氧化损伤^[19]。玉米 *ZmMAPK1* 过表达可通过增加干旱条件下的脯氨酸含量和降低 MDA 含量,提高转基因拟南芥的耐旱性^[20]。玉米 *ZmMPK3* 同样响应干旱胁迫,可提高其抗旱性^[21]。在干旱条件下,马铃薯 *StMAPK11* 明显上调,并通过提高抗氧化活性来增强其抗旱性^[22]。小麦 *TaMAPK6*、*TaMAPK16* 等基因的表达水平也受干旱胁迫调控^[23]。因此,*TaMAPK1* 基因功能缺失突变可能通过调控渗透调节物质的含量影响小麦耐旱性,并通过影响 MDA 和 H_2O_2 的含量导致其对干旱更加敏感。

3.2 *TaMAPK1* 同源基因在抗旱性中具有累加效应

多项研究也表明,基于多倍体作物中同源基因的功能协同与累加调控机制,同源基因加性效应已成为作物性状改良的重要遗传基础。多个同源基因的累加编辑可协同调控复杂农艺性状,为多基因聚合育种提供理论依据。本研究发现,双

突变体 *mapk1-aabb*、*mapk1-aadd* 的各项生理生化指标均较单突变体进一步恶化,而三突变体 *mapk1-aabdd* 的耐旱性最为脆弱。这一结果提示,*TaMAPK1-6A*、*TaMAPK1-6B*、*TaMAPK1-6D* 虽然在序列上高度同源,但在抗旱调控中可能具有功能互补或剂量效应。类似的功能叠加现象在小麦等其他多倍体作物中亦有报道,如 *TaDREB1*、*TaNAC* 等基因家族成员在抗旱中也表现出功能冗余与累加效应^[24]。研究表明,在小麦光周期响应基因 *TaPpd-1* 的同源基因中,*TaPpd-B1* 与 *TaPpd-D1* 的双突变在千粒重、籽粒大小、穗粒数等性状上表现出显著累加提升,而 *TaPpd-A1* 单突变则主要调控穗长,体现基因功能分化与协同增强^[25]。此外,*Ppd-1* 同源基因的不同等位变异组合在调控开花时间与穗部结构中也表现出显著的累加遗传效应^[26]。类似地,*TaGW2* 同源基因的编辑也显示其对籽粒大小和重量具有明显的加性贡献^[27],而 *TaEDR1* 三个同源基因突变缺失可协同增强小麦对白粉病的抗性^[28]。这可能是六倍体小麦在长期进化过程中形成的一种遗传缓冲机制,通过多个拷贝协同作用可增强其对逆境的适应能力。

3.3 *TaMAPK1* 作为抗旱育种候选基因的研究展望与育种应用

本课题组前期研究 *TaMAPK1* 过表达植株表现出更强的抗旱性^[5],而本研究则从功能缺失角度进一步证实了该基因在小麦抗旱中的正调控作用。这种“过表达增强、敲除减弱”的表型一致性,为 *TaMAPK1* 作为小麦抗旱育种的候选基因提供了双重证据。在分子机制上,*TaMAPK1* 可能通过磷酸化下游转录因子或调控胁迫相关基因的表达,整合多种信号途径,协同调控小麦的干旱应答^[29]。

尽管本研究明确了 *TaMAPK1* 在小麦苗期耐旱性中的功能及其同源基因的累加效应,但其下游调控网络及关键靶基因仍有待进一步解析。未来可通过转录组学、蛋白互作组学及基因编辑技术,系统阐明 *TaMAPK1* 在干旱信号转导中的作用机制。此外,结合分子标记辅助育种与基因编辑技术^[30],将 *TaMAPK1* 优异等位基因导入高产小麦品种,有望培育出兼具高产与抗旱特性的小麦新品种^[31-33],为干旱与半干旱地区的小麦生产提供品种支撑。

4 结论

TaMAPK1 基因其功能缺失突变导致小麦幼苗保水能力下降、渗透调节减弱、氧化损伤加剧、干旱胁迫复水后存活率显著降低,进一步证明了其正调控小麦苗期耐旱性。*TaMAPK1-6A*、*TaMAPK1-6B*和*TaMAPK1-6D*三个同源基因在抗旱性中具有累加效应,*mapk1*双突变及三突变体的抗旱性较单突变体进一步降低。

参考文献:

- [1]Curtis T, Halford N G. Food security: The challenge of increasing wheat yield and the importance of not compromising food safety [J]. *The Annals of Applied Biology*, 2014, 164 (3):354.
- [2]International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome [J]. *Science*, 2018, 361 (6403):eaar7191.
- [3]Zhang H, Li Y Y, Zhu J K. Developing naturally stress-resistant crops for a sustainable agriculture [J]. *Nature Plants*, 2018, 4 (12):989.
- [4]张潇予, 吴保为, 张思雨, 等. 小麦*TaMAPK1*基因的克隆及其功能研究[J]. 麦类作物学报, 2023, 43(5):537.
Zhang X Y, Wu B W, Zhang S Y, et al. Cloning and functional analysis of wheat *TaMAPK1* gene [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2023, 43(5):537.
- [5]胡昆芝. 小麦*TaMAPK1*和*TaNAK1*在非生物逆境胁迫应答中的作用研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2023.
Hu K Z. The effects of *TaMAPK1* and *TaNAK1* on abiotic stress in wheat [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2023.
- [6]吴保为. 小麦 miR5048 及其靶基因*TaMAPK1*和*TaNAK1.2*的生物学功能和作用机制探析[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2023.
Wu B W. Biological functions and mechanisms of miR5048 and its target genes *TaMAPK1* and *TaNAK1.2* in wheat (*Triticum aestivum* L.) [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2023.
- [7]Chi Q, Du L Y, Ma W, et al. The miR164-TaNAC14 module regulates root development and abiotic-stress tolerance in wheat seedlings [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2023, 22(4):981.
- [8]张楷. 陕西省土壤田间持水量分析研究[J]. 陕西水利, 2014 (2):19.
Zhang K. Analysis of soil field water capacity in Shaanxi Province [J]. *Shaanxi Water Resources*, 2014(2):19.
- [9]Du H, You J, Xiong L Z. Determination of water loss rate in rice leaves *in vitro* [J]. *Bio-101*, 2018; e1010159.
- [10]Lu S Y, Su W, Li H H, et al. Abscissic acid improves drought tolerance of triploid bermudagrass and involves H₂O₂- and NO-induced antioxidant enzyme activities [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47(2):132.
- [11]Shi H T, Wang Y P, Cheng Z M, et al. Analysis of natural variation in bermudagrass (*Cynodon dactylon*) reveals physiological responses underlying drought tolerance [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12):e53422.
- [12]Hu X Q, Fang C Y, Lu L, et al. Determination of soluble sugar profile in rice [J]. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2017, 1058:19.
- [13]Bates L S, Waldren R P, Teare I D. Rapid determination of free proline for water-stress studies [J]. *Plant and Soil*, 1973, 39(1):205.
- [14]Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, et al. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2001, 24(12):1337.
- [15]Hodges D M, Delong J M, Forney C F, et al. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds [J]. *Planta*, 1999, 207(4):604.
- [16]王川, 谢惠民, 王娜, 等. 小麦品种可溶性糖和保护性酶与抗旱性关系研究[J]. 干旱地区农业研究, 2011, 29(5):94.
Wang C, Xie H M, Wang N, et al. Study on the relation of soluble sugar, protective enzyme and drought resistance in wheat [J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2011, 29(5):94.
- [17]姜淑欣, 刘党校, 庞红喜, 等. PEG胁迫及复水对不同抗旱性小麦幼苗脯氨酸代谢关键酶活性的影响[J]. 西北植物学报, 2014, 34(8):1581.
Jiang S X, Liu D X, Pang H X, et al. Effects of PEG stress and recovery on activities of key enzymes involved in proline metabolism in wheat cultivars with difference in drought tolerance [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2014, 34(8):1581.
- [18]彭晓邦, 秦绍龙. 干旱胁迫对小麦萌发及苗期生理活性的影响[J]. 陕西农业科学, 2020, 66(9):1.
Peng X B, Qin S L. Effect of drought stress on wheat germination and physiological activity at seedling stage [J]. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 66(9):1.
- [19]周秒依, 任雯, 赵冰兵, 等. 植物 MAPK 级联途径应答的非生物胁迫研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2020, 22(2):22.
Zhou M Y, Ren W, Zhao B B, et al. Advances on the MAPK cascade pathway in response to abiotic stress in plant [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2020, 22 (2):22.
- [20]Chen J, Li K L, Le X C, et al. Metabolomic analysis of two rice (*Oryza sativa*) varieties exposed to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether [J]. *Environmental Pollution*, 2018, 237:308.
- [21]Kallqvist T, Grung M, Tollefsen K E. Chronic toxicity of 2,4,2',4'-tetrabromodiphenyl ether on the marine *Alga Skele-*

- tonema costatum* and the crustacean *Daphnia magna* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006, 25 (6): 1657.
- [22] Huang H L, Zhang S Z, Lü J T, *et al.* Experimental and theoretical evidence for diastereomer and enantiomer-specific accumulation and biotransformation of HBCD in maize roots [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(22): 12205.
- [23] Wu T, Wang S, Huang H L, *et al.* Diastereomer-specific uptake, translocation, and toxicity of hexabromocyclododecane diastereoisomers to maize [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(34): 8528.
- [24] Li C N, Li L, Reynolds M P, *et al.* Recognizing the hidden half in wheat: Root system attributes associated with drought tolerance [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(14): 5117.
- [25] Errum A, Rehman N, Uzair M, *et al.* CRISPR/Cas9 editing of wheat *Ppd-1* gene homoeologs alters spike architecture and grain morphometric traits [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2023, 23(1): 66.
- [26] Shaw L M, Turner A S, Herry L, *et al.* Mutant alleles of Photoperiod-1 in wheat (*Triticum aestivum* L.) that confer a late flowering phenotype in long days [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (11): e79459.
- [27] Wang W, Simmonds J, Pan Q L, *et al.* Gene editing and mutagenesis reveal inter-cultivar differences and additivity in the contribution of *TaGW2* homoeologues to grain size and weight in wheat [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2018, 131(11): 2463.
- [28] Zhang Y W, Bai Y, Wu G H, *et al.* Simultaneous modification of three homoeologs of *TaEDR1* by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat [J]. *The Plant Journal*, 2017, 91(4): 714.
- [29] Mao X, Zhang H, Qian X, *et al.* *TaSnRK2.9*, a sucrose non-fermenting 1-related protein kinase gene, positively regulates plant response to drought and salt stress in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2012, 35 (11): 1938.
- [30] Chi Y, Li Z, Wang R, *et al.* Genome editing in wheat via CRISPR/Cas9: current progress and future prospects [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2023, 50(2): 89.
- [31] 张育哲, 王博华, 孙娜, 等. 冬小麦苗期抗旱性综合评价与指标筛选[J]. 麦类作物学报, 2025, 45(12): 1647.
- Zhang Y Z, Wang B H, Sun N, *et al.* Comprehensive evaluation and indicator screening of drought tolerance in winter wheat seedlings [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2025, 45 (12): 1647.
- [32] 张余周, 王一钊, 高茹茜, 等. 小麦根系构型及抗旱性研究进展[J]. 中国农业科学, 2024, 57(9): 1633.
- Zhang Y Z, Wang Y Z, Gao R Q, *et al.* Research progress on root system architecture and drought resistance in wheat [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2024, 57(9): 1633.
- [33] 王应党, 林坤, 郭凌云, 等. 小麦抗旱鉴定和评价方法研究进展[J]. 中国种业, 2024(2): 1.
- Wang Y D, Lin K, Guo L Y, *et al.* Research progress on identification and evaluation methods of drought resistance of wheat [J]. *China Seed Industry*, 2024(2): 1.