网络出版时间:2025-12-05 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.06.007

*TaMKK9*调控小偃6号高温抗条锈性研究

冯俊佳,刘玉洋,李海,胡小平

(西北农林科技大学 植物保护学院 植保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] 【目的】探究 *TaMKK9* 在小偃6号高温抗条锈病过程中发挥的功能,揭示MAPK级联参与小麦高温抗条锈病的分子机理,完善小麦高温抗病调控网络。【方法】在烟草叶片中进行TaMKK9亚细胞定位;利用病毒诱导的基因沉默和病毒诱导的基因过表达,研究 *TaMKK9* 在小麦高温抗条锈病中发挥的作用;采用实时荧光定量PCR,检测 *TaMKK9* 及抗病相关基因的表达量;通过酵母双杂交筛选TaMKK9下游互作靶标,并运用双分子荧光互补(BiFC)、免疫共沉淀(Co-IP)及GST Pull-down试验验证TaMKK9与TaMPK3的互作关系。【结果】TaMKK9是定位于细胞膜、细胞质和细胞核的蛋白激酶。实时荧光定量PCR结果表明,受条锈菌和高温双重诱导,小偃6号 *TaMKK9* 的表达上调5.17倍;与对照组相比,沉默 *TaMKK9* 的小偃6号植株接种条锈菌后,叶片表面的条锈菌夏孢子堆显著增多,防御相关基因 *TaPR1* 的表达降低66.9%~94.4%,转高温24和48 h后叶片 H_2O_2 积累量分别下降29.9%和59.5%;过表达 *TaMKK9* 的小偃6号植株接种条锈菌后,条锈菌生物量降低60.5%~72.0%,小麦植株抗病性显著增强。TaMKK9与TaMPK3互作验证结果表明,TaMKK9与TaMPK3存在互作。【结论】在小偃6号高温抗条锈病过程中,受条锈菌和高温双重诱导,导致 *TaMKK9* 表达量显著增加。TaMKK9与下游TaMPK3互作传递免疫信号,参与ROS信号通路,通过影响小麦植株 H_2O_2 的积累正调控小麦植株对条锈菌的抗性。

[关键词] 条锈菌;小偃6号;高温抗条锈性;MAPK

[中图分类号] S435.121.4+2 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)06-0062-10

Study on *TaMKK9* in regulating the high-temperature resistance of wheat cultivar Xiaoyan 6 to stripe rust

FENG Junjia, LIU Yuyang, LI Hai, 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 of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: 【Objective】 This study aims to explore the function of *TaMKK9* in the process of high-temperature induced stripe rust resistance in Xiaoyan 6, and to elucidate the molecular mechanism underlying the involvement of the MAPK (mitogen-activated protein kinase) cascade in wheat's high-temperature induced stripe rust resistance, in order to refine the regulatory network for disease resistance in wheat under high-temperature conditions. 【Method】 Virus-induced gene silencing and virus-induced gene overexpression were used to explore the role of TaMKK9 in wheat's resistance to stripe rust under high-temperature conditions. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression levels of *TaMKK9* and other genes related to disease resis-

[收稿日期] 2025-04-18 [修回日期] 2025-06-16

[基金项目] 科技部国际合作项目(KY202002018,G2023172013L);国家现代农业(小麦)产业技术体系项目(CARS-03-37);国家自然科学基金项目(31972219);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)

[作者简介] 冯俊佳(2001—),女,山东日照人,在读硕士,主要从事小麦抗条锈病研究。E-mail:15689635616@163.com

[通信作者] 胡小平(1971—),男,宁夏固原人,教授,博士生导师,主要从事植物病理学研究。E-mail:xphu@nwsuaf.edu.cn

tance. Downstream interaction targets of TaMKK9 were screened by yeast two-hybridization, and the interaction relationship was verified by BiFC, Co-IP, and GST Pull-down.【Result】TaMKK9 was a protein kinase loca-lized to the cell membrane, cytoplasm, and nucleus. Real-time quantitative PCR validation showed that the expression level of *TaMKK*9 in Xiaoyan 6 was upregulated by 5.17 times, which was induced by stripe rust and high temperature. Compared to the control, Xiaoyan 6 plants with *TaMKK*9 silenced exhibited more uredinium on leaf surfaces after stripe rust inoculation, accompanied by a 66.9%－94.4% reduction in the expression of the defense-related gene *TaPR*1. After exposure to high temperature for 24 and 48 hours, H_2O_2 accumulation in leaves decreased by 29.9% and 59.5%, respectively. Overexpression of the *TaMKK*9 gene in Xiaoyan 6 plants resulted in a 60.5%－72.0% reduction in stripe rust fungus biomass and significantly enhanced disease resistance in wheat plants. The interaction verification results between TaMKK9 and TaMPK3 indicated that TaMKK9 interacted with the downstream TaMPK3.【Conclusion】During the resistance process against stripe rust in Xiaoyan 6 under high-temperature conditions, the expression level of *TaMKK*9 increased due to dual induction by stripe rust and temperature. TaMKK9 interacted with the downstream TaMPK3 to transmit immune signals and positively regulates the resistance of wheat plants to stripe rust by affecting H_2O_2 accumulation in plants.

Key words: stripe rust; Xiaoyan 6; high temperature resistance to stripe rust; MAPK

作为我国第二大粮食作物，小麦是保障粮食安全的重要支柱。小麦条锈病是由条形柄锈菌小麦专化型（*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, *Pst.*）引起的危害小麦生产的重要病害[1]。据统计，20世纪40年代至今，小麦条锈病在中国发生了8次大流行，累计造成小麦产量损失近140亿kg[2]。种植抗病品种是防控小麦条锈病流行最有效的方法之一，但由于条锈菌毒性变异频繁，导致小种专化型小麦抗病品种的抗性丧失[3]。因此，选育具有非小种专化型的持久抗病品种是防治小麦条锈病的重要举措[4]。

高温抗条锈性是指在相对较高环境温度下表现的一种低反应型抗病性，具有持久性和非小种专化性的特点[5]。根据高温诱导产生抗条锈性的时期不同，可分为成株期高温抗病性（HTAP）和全生育期高温抗病性（HTAS）[6-7]。小偃6号是典型的全生育期高温抗病小麦品种，由长穗偃麦草与普通小麦杂交育成[8]。在常温（15 ℃）下小偃6号对条锈菌为感病反应，在潜育后期经高温（18～21 ℃）诱导6～12 h后，转变为抗病反应[9]。进一步研究发现，诱导小偃6号高温抗条锈病的最佳条件为花斑期（接菌后8 d）20 ℃处理24 h[10]。

为探究小偃6号与条锈菌、温度互作的分子机制，对小偃6号进行转录组测序分析，共检测到1 395个差异表达基因[11]。其中，转录因子TaWRKY70、TaWRKY62和TaWRKY45，均含有LRR-RLK类受体激酶TaXa21和TaSERK1，NBS-LRR免疫受体TaRPM1和TaRPS2，富含半胱氨酸类受体激酶TaCRK10和胞质类受体激酶TaRIPK，正向调控小麦高温全生育期抗条锈病过程[12-19]；TaWRKY49负向调控小麦高温全生育期抗条锈病过程[13]。另外，条锈菌效应子也参与小偃6号全生育期高温抗病性过程。其中PSTG_11208能增强小麦对条锈菌的抗性，PstCEP1则通过与PSTG_11208互作抑制PSTG_11208对小麦条锈病的抗性，增强条锈菌的致病性，进而影响小偃6号的高温抗病性[20]；PSTG_01766通过抑制TaRIPK诱导的TaPLCP1磷酸化降低小麦对条锈菌的抗性[16]。关于MAPK级联通路参与小偃6号高温抗条锈病的研究还相对空白。从小偃6号的1 395个差异表达基因中鉴定到1个MAPK级联信号通路成员*TaMKK*9，前期研究发现，接菌后高温处理能使*TaMKK*9的表达上调4.82倍。本研究通过*TaMKK*9基因沉默与过表达、下游互作靶标筛选等，探索*TaMKK*9参与小麦高温抗条锈病的功能，以期为完善小偃6号高温抗条锈病分子调控网络奠定基础。

1　材料与方法

1.1　供试材料

植物材料为小偃6号、铭贤169小麦品种以及本氏烟草，均由本实验室保存。小麦生长条件为白天15 ℃、黑夜12 ℃，光周期为16 h光照、8 h黑暗；烟草生长条件为25 ℃恒温培养，光周期为16 h光照、8 h黑暗。条锈菌为32号生理小种（CYR32），在条锈菌感病品种铭贤169上进行扩繁。

1.2 试验方法

1.2.1 亚细胞定位 将*TaMKK9*基因ORF区全长构建到pCAMBIA1302-eGFP载体中,获得带有eGFP标签的重组质粒,利用农杆菌介导的瞬时表达法,分别与带有RFP标签的细胞核定位Marker TaWRKY33-RFP[21]、膜定位Marker TaPsIPK1-RFP[22]共同转化烟草。2~3 d后制作烟草叶片切片,在激光共聚焦显微镜下观察eGFP与RFP蛋白的荧光情况。

1.2.2 *TaMKK9*基因表达检测 将小偃6号小麦植株分为4组,设置4个处理,分别为:不接菌常温培养(N Mock)、接菌常温培养(N)、接菌转高温(接菌8 d后20 ℃处理24 h)培养(NHN)和不接菌转高温培养(NHN Mock)。分别在接菌后0,72,192,204,216,240,264,312 h取小麦叶片,检测*TaMKK9*基因在小偃6号高温抗条锈病过程中的表达情况。

1.2.3 病毒诱导基因沉默(VIGS) 比对小麦基因组A、B、D 3个拷贝中的*TaMKK9*序列,选取ORF区特异性基因片段,通过同源重组连接构建到BSMV:γ载体中,得到重组质粒BSMV:目的基因。将病毒骨架载体BSMV:α、BSMV:β、BSMV:γ、BSMV:TaPDS(八氢番茄红素脱氢酶,类胡萝卜素生物合成途径关键基因)、BSMV:TaMKK9进行线性化,使用RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7试剂盒进行体外转录,摩擦接种小偃6号小麦叶片。空白对照(MOCK)不接种,对照组BSMV:00接种BSMV:α、BSMV:β和BSMV:γ空载体,试验组BSMV:TaMKK9接种BSMV:α、BSMV:β和BSMV:TaMKK9,阳性对照BSMV:TaPDS接种BSMV:α、BSMV:β和BSMV:TaPDS。当阳性对照出现光漂白现象时,接种条锈菌。分别在接菌后0,12,24和48 h取小麦叶片,检测*TaMKK9*表达量;接菌8 d后转高温处理(20 ℃处理24 h),分别在高温处理0,12,24和48 h后取小麦叶片,检测防御相关基因*TaPR1*的表达量。分别取高温处理后24和48 h小麦叶片样品约0.1 g,使用过氧化氢(H_2O_2)含量试剂盒检测叶片的H_2O_2积累量。

1.2.4 病毒诱导基因过表达(VOX) 将*TaMKK9*基因ORF区全长序列构建到BSMV:γ_2载体中,得到VOX:TaMKK9。将病毒骨架载体BSMV:α、BSMV:β、BSMV:γ_1、BSMV:γ_2、VOX:TaMKK9进行线性化和体外转录,接种小偃6号小麦植株的第二叶,空白对照MOCK不接种;对照组VOX:00接种BSMV:α、BSMV:β、BSMV:γ_1和BSMV:γ_2空载体;试验组VOX:TaMKK9接种BSMV:α、BSMV:β、BSMV:γ_1和BSMV:TaMKK9。当小麦叶片出现褪绿现象后接种条锈菌。分别在接菌0,24,48和120 h后取小麦叶片,用于*TaMKK9*基因表达量检测;分别在接菌后9和14 d取小麦叶片,用于条锈菌生物量检测。

1.2.5 酵母双杂交筛选互作蛋白 参考上海欧易生物核体系的酵母双杂系统,将*TaMKK9*基因ORF区全长序列构建到pGBKT7载体中,转化酵母感受态细胞Y2H Gold(上海唯地公司),进行*TaMKK9*基因自激活与毒性检测。克隆得到小偃6号基因组中的6个MAPKs,并构建到pGADT7载体中,与TaMKK9进行一对一互作验证,筛选TaMKK9下游靶标。

1.2.6 双分子荧光互补 将诱饵基因ORF全长序列连接至CeYFP载体中,候选靶标连接到NeYFP载体中,进行双分子荧光互补(BiFC)试验。利用农杆菌介导的瞬时表达法在烟草中进行瞬时表达,2~3 d后,制作烟草叶片切片,在激光共聚焦显微镜下观察YFP蛋白的荧光情况。

1.2.7 免疫共沉淀与GST Pull-down试验 将诱饵基因和靶标基因分别构建到pCAMBIA1302-eGFP和pCAMBIA1302-RFP载体中,分别获得带有eGFP和RFP蛋白标签的重组质粒;利用农杆菌介导的瞬时表达法转化烟草,3~4 d后使用NP40裂解液提取烟草叶片总蛋白。参考GFP trap琼脂糖珠(武汉三鹰公司)使用说明进行免疫共沉淀(Co-IP)试验,分别用GFP Tag Monoclonal antibodies和Flag Tag Monoclonal antibodies(武汉三鹰公司)进行检测。

构建诱饵基因和靶标基因的原核表达载体,获得带有6×His和GST蛋白标签的重组蛋白,参考BeyoGold™ GST-tag Purification Resin(上海碧云天公司)说明书进行GST Pull-down试验,分别用GST Tag Monoclonal antibodies和His Tag Monoclonal antibodies(武汉三鹰公司)进行检测。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 基因表达量检测 使用植物总RNA提取试剂盒(上海Promega公司)提取小麦叶片总RNA,使用Primer Script RT Master Mix(日本TaKaRa公司)进行反转录合成cDNA。使用LightCycler 480

荧光定量 PCR 仪（瑞士 Roche 公司）进行基因表达量检测，qRT-PCR 试剂使用 UltraSYBR Mixture（泰州康为世纪公司），基因相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。

1.3.2　H_2O_2 含量检测　称取约 0.1 g 小麦叶片，液氮研磨后加入 1 mL 丙酮，充分混匀后在 4 ℃、8 000 *g* 离心 10 min，取上清，使用过氧化氢含量（H_2O_2）试剂盒（苏州科铭公司）检测 H_2O_2 含量。

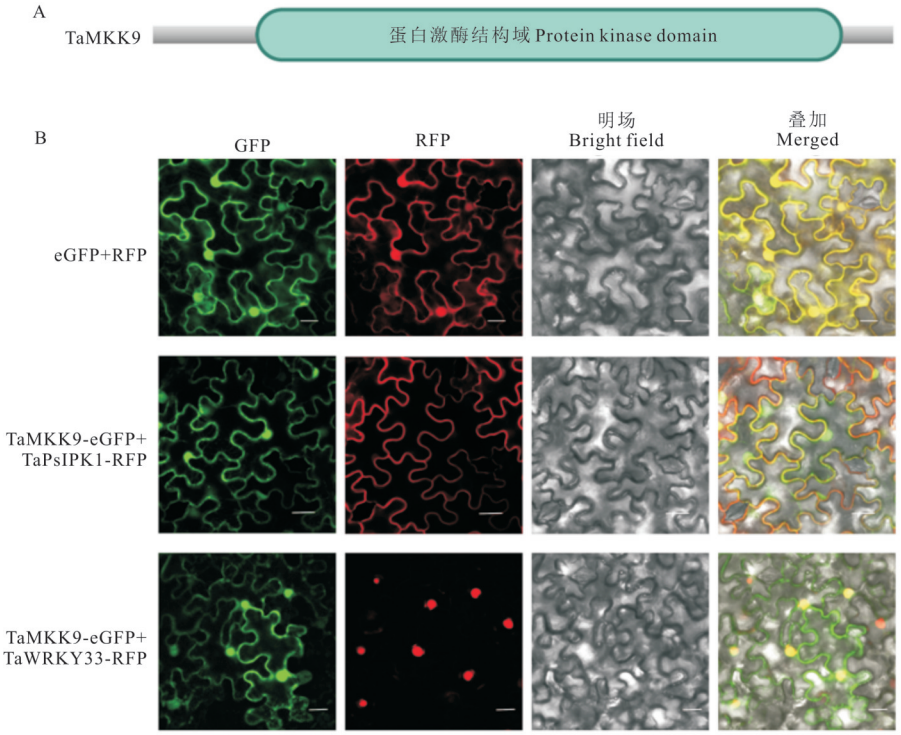
1.4　数据处理与分析

采用 Microsoft Excel 2019 对试验数据进行统计及绘图，采用 SPSS 26.0 进行差异显著性检验，图中数据以“平均值±标准误”表示。

2　结果与分析

2.1　TaMKK9 基本信息及其亚细胞定位

TaMKK9 编码 343 个氨基酸，相对分子质量为 36.38 ku，理论等电点为 8.44。TaMKK9 结构域预测结果（图 1-A）表明，该蛋白有 1 个蛋白激酶结构域。以 TaPsIPK1-RFP 作为细胞膜定位 Marker，TaWRKY33-RFP 作为细胞核定位 Marker，在烟草叶片中进行 TaMKK9 亚细胞定位，结果（图 1-B）发现，TaMKK9 的定位与 TaPsIPK1 和 TaWRKY33 均有重合，表明 TaMKK9 定位于细胞质、细胞核和细胞膜。



A. TaMKK9 结构域预测，绿色为蛋白激酶结构域；B. 烟草叶片细胞中 TaMKK9 的亚细胞定位；GFP. eGFP、TaMKK9-eGFP 蛋白的定位；RFP. RFP、TaPsIPK1-RFP、TaWRKY33-RFP 的定位；TaPslPK1-RFP. 细胞膜定位 Marker；TaWRKY33-RFP. 细胞核定位 Marker；标尺＝50 μm。

A. Domain prediction of TaMKK9, green region is the protein kinase domain; B. Subcellular localization of TaMKK9 in tobacco leaf cells; GFP. Localization of eGFP and TaMKK9-eGFP; RFP. Localization of RFP, TaPsIPK1-RFP, and TaWRKY33-RFP; TaPslPK1-RFP as plasma membrane localization Marker; TaWRKY33-RFP as nuclear localization Marker; Bars＝50 μm.

图 1　TaMKK9 结构域预测及其亚细胞定位

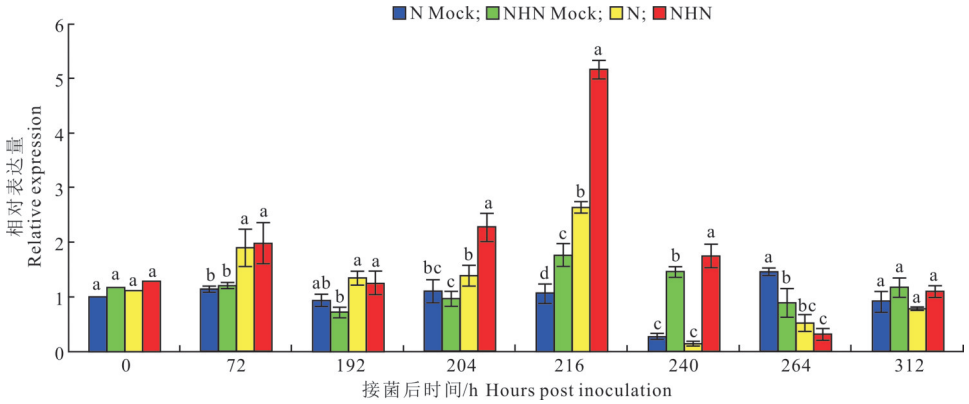
Fig. 1　Domain prediction and subcellular localization of TaMKK9

2.2　TaMKK9 正调控小偃 6 号高温抗条锈性

采用实时荧光定量 PCR 验证 *TaMKK9* 在小偃 6 号植株高温抗条锈病过程中的表达模式。结果（图 2）表明，与不接菌常温培养（N Mock）相比，接菌 192 h 后进行转高温（20 ℃处理 24 h）诱导（NHN），诱导 24 h 后（即接菌后 216 h）*TaMKK9* 的表达水平上调 5.17 倍；而转高温不接菌组（NHN Mock），*TaMKK9* 基因的表达水平仅上调 1.77 倍，表明 *TaMKK9* 的表达受条锈菌和高温的双重诱导。

病毒诱导小偃 6 号 *TaMKK9* 基因沉默后，观察小麦叶片的发病情况，发现转高温处理组（NHN），沉默 *TaMKK9* 基因后小麦叶片条锈菌夏孢子堆明显增多（图 3-A）。*TaMKK9* 基因表达量的实时荧光定量 PCR 检测结果（图 3-B）表明，与对照组相

比,接种BSMV:γ-*TaMKK9*的小麦植株基因表达量降低了31.6%~61.9%。在转高温24和48 h分别检测小麦叶片中的H_2O_2积累量,结果(图3-C)发现,与对照组相比,沉默*TaMKK9*基因后小麦植株中H_2O_2的积累量分别显著下降29.9%和59.5%。未沉默*TaMKK9*基因的小麦植株经高温诱导后防御相关基因*TaPR1*表达上调2.77倍,而沉默*TaMKK9*基因小麦植株中*TaPR1*的表达量显著低于未沉默组66.9%~94.4%(图3-D)。上述结果表明,*TaMKK9*基因沉默显著降低了小偃6号的高温抗条锈性。

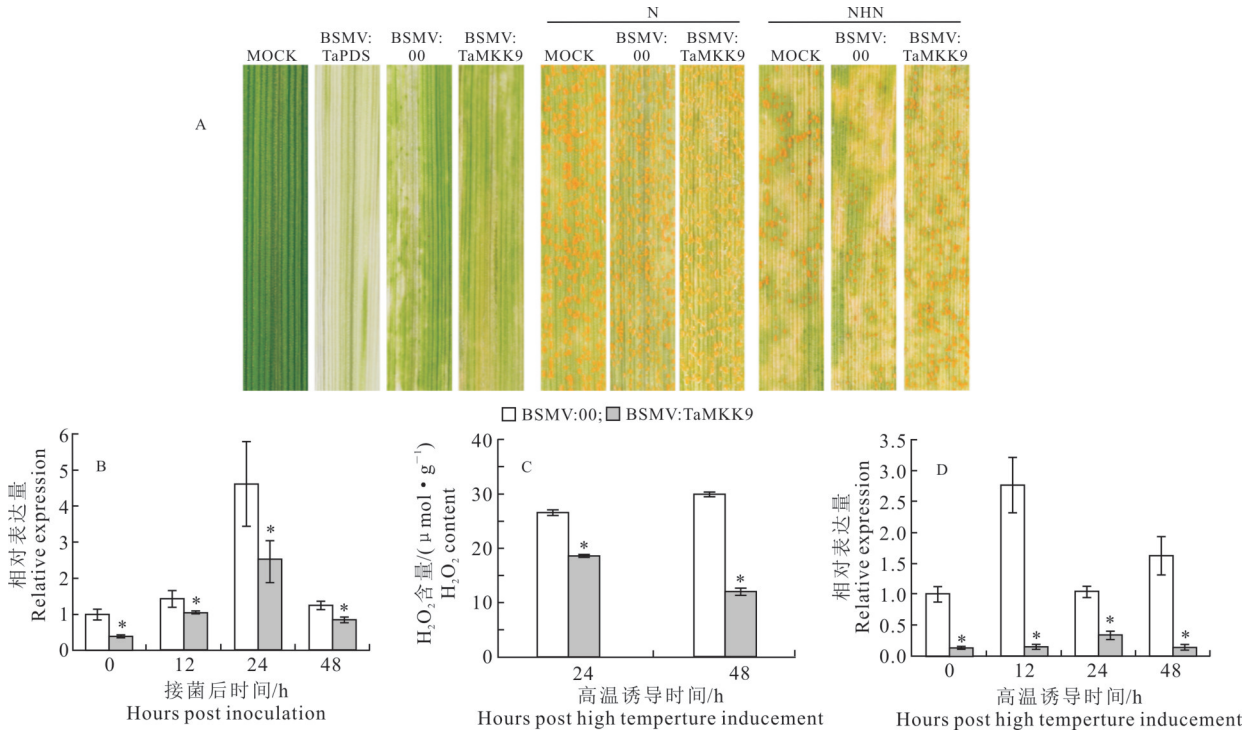


图柱上标不同小写字母表示同一时间不同处理间差异显著($P<0.05$)。

Different lowercase letters marked on the column indicate significant differences between different treatments at the same time ($P<0.05$).

图2 *TaMKK9*在小麦高温抗条锈过程中的时序表达

Fig. 2 Temporal expression detection of *TaMKK9* during wheat resistance to stripe rust under high-temperature



A. *TaMKK9*基因沉默植株接菌表型;B. 基因沉默植株*TaMKK9*表达量检测;C. *TaMKK9*基因沉默后叶片H_2O_2积累量测定;D. *TaMKK9*基因沉默植株*TaPR1*表达量检测;*表示处理间差异显著($P<0.05$)。

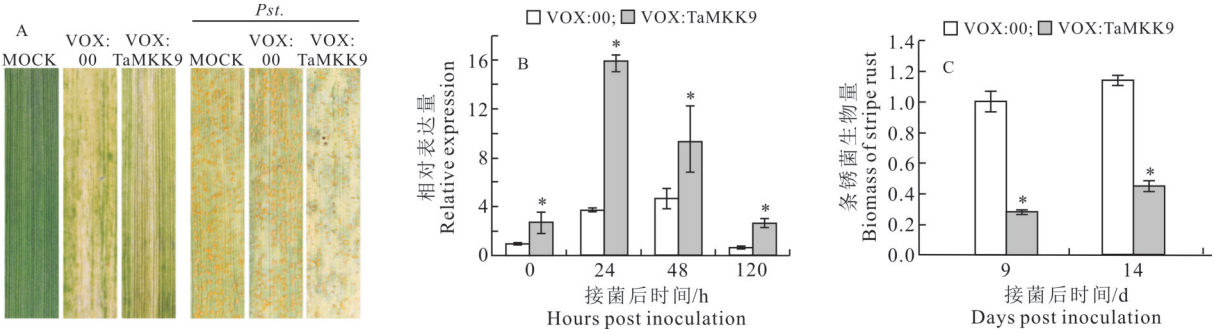
A. Phenotype analysis of *TaMKK9*-silenced plants after inoculation; B. Expression analysis of *TaMKK9* in silenced plants; C. Measurement of H_2O_2 accumulation in leaves after *TaMKK9* gene silencing; D. Expression analysis of *TaPR1* in *TaMKK9*-silenced plants; * means significant difference between treatments ($P<0.05$).

图3 病毒诱导小偃6号*TaMKK9*基因沉默表型分析

Fig. 3 Phenotype analysis of virus-induced silencing of *TaMKK9* gene in Xiaoyan 6

将*TaMKK9*基因ORF区全长构建到载体BSMV:γ_2中,诱导小偃6号小麦植株*TaMKK9*基因

过表达。接种条锈菌后，过表达植株叶片表面条锈菌夏孢子堆数量明显少于对照组（图 4-A），*TaMKK9* 表达量检测结果（图 4-B）表明，过表达植株 *TaMKK9* 基因相对表达量较对照组植株上调 1.98～4.27 倍，另外，过表达 *TaMKK9* 植株条锈菌生物量显著低于对照组 60.5%～72.0%（图 4-C）。进一步说明 *TaMKK9* 在小偃 6 号高温抗条锈病中发挥正调控作用。



A. *TaMKK9* 基因过表达植株接菌表型；B. 过表达植株 *TaMKK9* 表达量检测；C. *TaMKK9* 过表达植株接菌后条锈菌生物量检测；*表示处理间差异显著（$P<0.05$）。

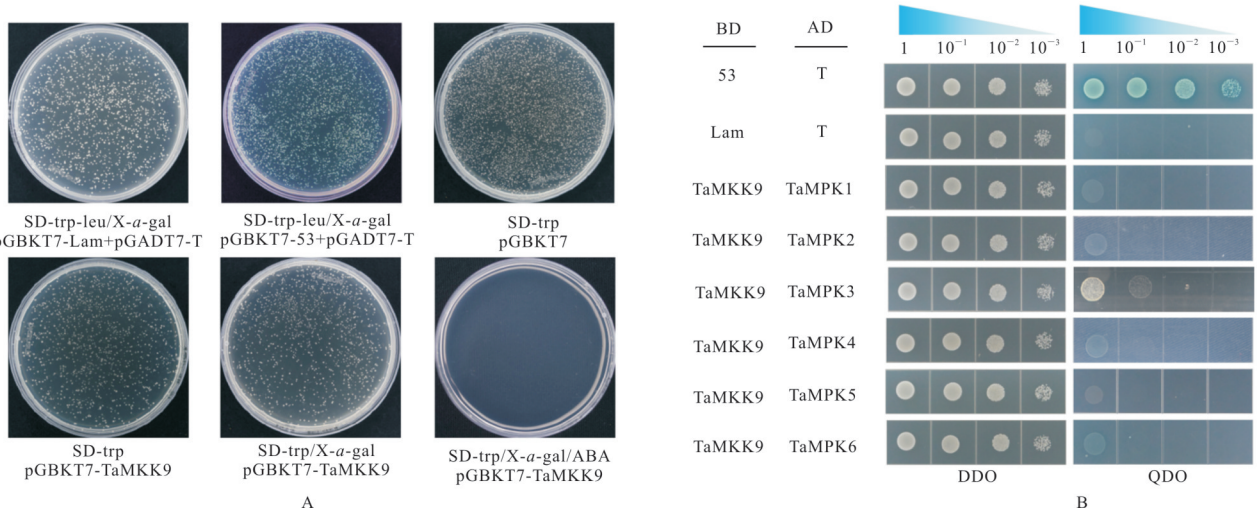
A. Phenotype analysis of *TaMKK9*-overexpressing plants after pathogen inoculation; B. Expression analysis of *TaMKK9* in overexpressing plants; C. Quantification of stripe rust fungal biomass in *TaMKK9*-overexpressing plants post inoculation; * means significant difference between treatments ($P<0.05$).

图 4　病毒诱导小偃 6 号 *TaMKK9* 过表达表型分析

Fig. 4　Phenotype analysis of virus-induced overexpression of *TaMKK9* gene in Xiaoyan 6

2.3　TaMKK9 与 TaMPK3 互作验证

由图 5-A 可知，转入 pGBKT7-TaMKK9 的酵母在 SD-Trp 上生长正常，在 SD-Trp/X-α-gal 上不会变蓝，在 SD-Trp/X-α-gal/ABA 上无法生长，说明 TaMKK9 无自激活活性且无毒性。克隆得到 6 个小麦 *TaMAPKs*，构建重组质粒 pGADT7-TaMAPKs，通过酵母双杂交系统验证其与 TaMKK9 互作关系，结果（图 5-B）表明，在 SD-Leu-Trp（DDO）培养基上所有组合均能正常生长，在 SD-Leu-Trp-His-Ade（QDO）培养基上只有共转 TaMKK9 与 TaMPK3 的酵母和阳性对照能够生长，说明 TaMKK9 与 TaMPK3 存在互作。



A. TaMKK9 自激活验证；pGBKT7-35+pGADT7-T. 阳性对照；pGBKT7-Lam + pGADT7-T. 阴性对照；pGBKT7. 空白对照。B. 酵母双杂交筛选与 TaMKK9 互作的 MAPKs。

A. Auto-activation validation of TaMKK9; pGBKT7-35+pGADT7-T. Positive control; pGBKT7-Lam+pGADT7-T. Negative control; pGBKT7. Empty vector. B. Yeast two-hybrid screening for MAPKs interacting with TaMKK9.

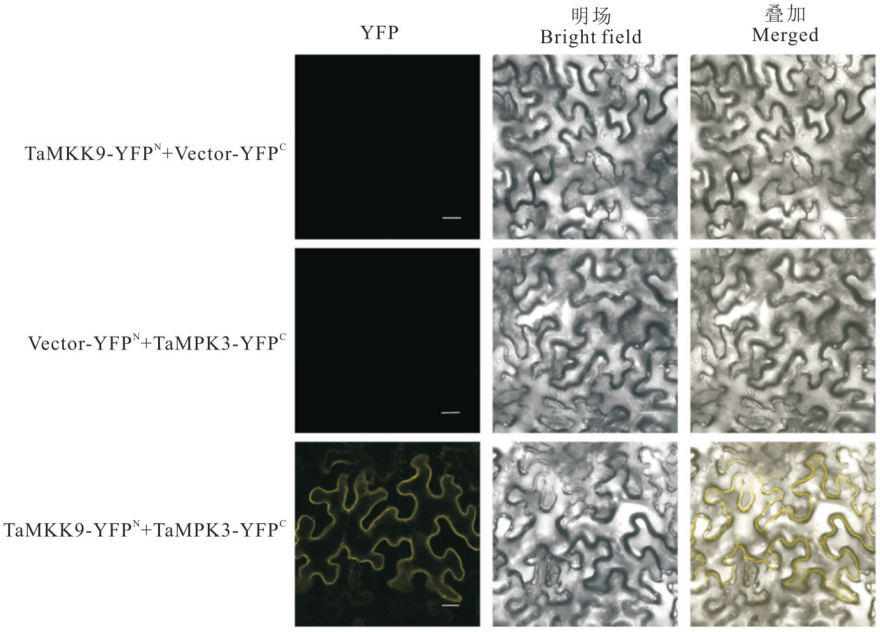
图 5　酵母双杂交筛选 TaMKK9 互作蛋白

Fig. 5　Screening for TaMKK9 interacting proteins by yeast two-hybrid

烟草叶片中 BiFC 结果（图 6）显示，共注射 TaMKK9-YFP^N+TaMPK3-YFP^C 的烟草叶片细胞，可以在细胞质和细胞膜上观察到黄色荧光，表明 TaMKK9 与 TaMPK3 在细胞质和细胞膜上发生

互作。

为证明TaMKK9与TaMPK3是否存在直接的物理互作,原核表达GST蛋白、TaMKK9重组融合蛋白His-TaMKK9和TaMPK3激酶结构域的重组融合蛋白GST-TaMPK3-KD,GST-Pull-down结果(图7-A)发现,GST无法下拉His-TaMKK9,GST-TaMPK3-KD能够下拉His-TaMKK9,说明TaMKK9与TaMPK3可以在体外发生直接的物理互作。在烟草叶片中共表达RFP-TaMPK3与GFP-TaMKK9,提取发光烟草叶片总蛋白,Co-IP结果(图7-B)发现,GFP不能共沉淀RFP-TaMPK3,而重组蛋白GFP-TaMKK9能够共沉淀到RFP-TaMPK3,表明TaMKK9与TaMPK3能够在体内互作。

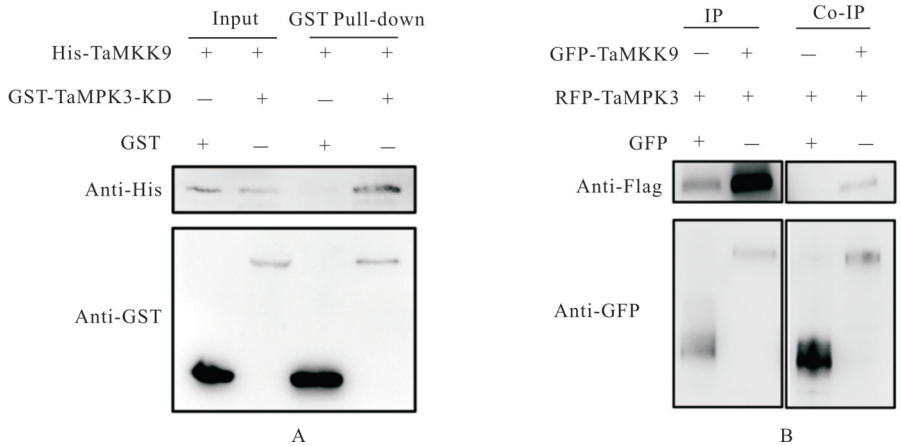


YFP指示两个蛋白的互作,标尺=50 μm。

YFP indicates protein-protein interactions between two target proteins, Bars=50 μm.

图6 BiFC验证TaMKK9与TaMPK3的互作

Fig. 6 BiFC validation of TaMKK9-TaMPK3 interaction



A. GST Pull-down验证TaMKK9与TaMPK3激酶结构域(KD)体外互作;B. Co-IP验证TaMKK9与TaMPK3体内互作。

A. GST Pull-down validation of interaction between TaMKK9 and the kinase domain (KD) of TaMPK3 in *vitro*;

B. Co-IP validation of TaMKK9-TaMPK3 interaction in *vivo*.

图7 Pull-down和Co-IP验证TaMKK9与TaMPK3互作

Fig. 7 Validation of interaction between TaMKK9 and TaMPK3 by Pull-down and Co-IP

3 讨论与结论

本研究聚焦于MAPK级联中的MAPKK即TaMKK9,探究TaMKK9参与小麦高温抗条锈的分子机理。依据系统发育分析MAPKK可分为4组:A组包括MKK1、MKK2和MKK6,B组包括

MKK3，C 组包括 MKK4 和 MKK5，D 组包括 MKK7、MKK8、MKK9 和 MKK10[23]。已有研究发现，MKK1 和 MKK2 作用于 MPK4，负向调控植物免疫过程[24-25]；MKK3 能够通过调控 MPK6，参与 JA 信号通路的调节，进而影响植物对病原物的响应[26]；MKK4 和 MKK5 在 MPK3 和 MPK6 的上游调控植物免疫反应[26-27]，在 MPK1 和 MPK2 的上游调控植物的生长发育等[28]。TaMKK9 为 D 组成员，目前研究较少。有研究表明，水稻 D 组的 OsMKK10-2 作用于 OsMPK3，调控转录因子 OsWRKY31 的稳定性，进而影响水稻对稻瘟病的抗性及生长发育表型[29]。

本研究结果表明，TaMPK3 与 TaMKK9 互作，可能参与 TaMKK9 正向调节小麦高温抗条锈病过程。已有研究表明，MAPK 家族成员可以分成 A、B、C、D 共 4 组[30]，其中 A 组包括 MPK3 和 MPK6，不仅参与调控植物的生长发育过程，也参与生物胁迫的响应过程。WRKY33 能够被 MPK3/MPK6 磷酸化以促进 ACC（1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid）合成酶 ACS2 和 ACS6 以及植保素（camalexin）生物合成基因的表达[31-32]；MPK3/MPK6 与转录因子 WRKY18 相互作用并磷酸化，促进 WRKY18 调节蛋白磷酸酶基因 *AP2C1* 和 *PP2C5* 的表达，从而达到调节 PTI 和 ETI 的作用[33]；MPK3/MPK6 在响应灰芽孢杆菌感染过程中增加了 ERF6 蛋白在体内的稳定性，进而增强植物免疫[34]。在细胞质和细胞膜中，TaMKK9 通过与 TaMPK3 的互作传递免疫信号，而在细胞核中也存在 TaMKK9 定位，能够通过其他途径将信号传递到细胞核，进而启动一系列防卫反应。

已有研究发现，小偃 6 号高温抗条锈过程与 H_2O_2 信号通路相关[14,17]。本研究结果表明，*TaMKK9* 基因沉默会降低小麦叶片 H_2O_2 积累量，可能通过调节 ROS 信号通路调控小偃 6 号抗病过程。ROS 包括超氧阴离子（$O_2^{\cdot-}$）、过氧化氢（H_2O_2）、羟基自由基（·OH）和一氧化氮（NO），其不仅可以作为信号分析激活植物防御反应，也能抑制或直接杀死病原菌[35-36]。其中 H_2O_2 反应性较低，可以跨膜扩散，使其成为一种重要的信号分子[37]。植物免疫中的 ROS 信号主要由呼吸爆发氧化酶同源蛋白 RBOHs 产生，RBOH 酶将电子从细胞质中的 NADPH 转移到质外体中的氧气产生 $O_2^{\cdot-}$，进而通过质外体中的超氧化物歧化酶（SOD）转化为 H_2O_2，H_2O_2 可以被过氧化氢酶（CAT）清除[37-38]。推测 TaMKK9 可能通过影响 ROS 信号通路中关键酶的活性来影响 H_2O_2 的积累量。

MAPK 级联中 MAPKKK 磷酸化 S/TXXXXXS/T 基序中的丝氨酸或苏氨酸残基激活 MAPKK，MAPKK 再通过磷酸化 TEY 或 TDY 的苏氨酸和酪氨酸残基激活 MAPK，MAPK 将信号传递到下游转录因子、酶或其他蛋白，实现逐级活化，从而将胁迫信号传递并放大，引起细胞内一系列生理生化反应，实现细胞抗逆功能[39-40]。后续研究将验证 TaMKK9 对 TaMPK3 的磷酸化，同时寻找与 TaMKK9 互作的 MAPKKK 和 TaMPK3 下游靶标，结合生物信息学预测与蛋白质谱分析等方法寻找磷酸化位点，利用位点突变探究磷酸化修饰对蛋白功能的影响，将参与调控小偃 6 号高温抗锈性 MAPK 级联信号通路补充完整。

本研究对 MAPK 级联通路成员 TaMKK9 参与调控小偃 6 号高温抗条锈病的功能进行了探究，发现在小偃 6 号高温抗条锈过程中，条锈菌与高温的双重诱导导致 *TaMKK9* 表达量增加，TaMKK9 与 TaMPK3 互作传递免疫信号，参与 ROS 信号通路，通过影响叶片中的 H_2O_2 积累来调控小麦高温抗条锈过程。

[参考文献]

[1] 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): 314-337.

[2] 刘万才，王保通，赵中华，等. 我国小麦条锈病历次大流行的历史回顾与对策建议[J]. 中国植保导刊，2022，42(6)：21-27，41.
LIU W C, WANG B T, ZHAO Z H, et al. Historical review and counter measures of wheat stripe rust epidemics in China [J]. China Plant Protection, 2022, 42(6): 21-27, 41.

[3] 胡小平，王保通，康振生. 中国小麦条锈菌毒性变异研究进展[J]. 麦类作物学报，2014，34(5)：709-716.
HU X P, WANG B T, KANG Z S. Research progress on virulence variation of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China[J]. Journal of Triticeae Crops, 2014, 34(5): 709-716.

[4] LINE R F, CHEN X M. Successes in breeding for and managing durable resistance to wheat rust[J]. Plant Disease, 1995, 79(12): 254-255.

[5] QAYOUM A. High-temperature, adult-plant resistance to stripe rust of wheat[J]. Phytopathology, 1985, 75(10): 1121.

[6] CHEN X M. Review article: high-temperature adult-plant resistance, key for sustainable control of stripe rust[J]. American Journal of Plant Sciences, 2013, 4(3): 608-627.

[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):35-38.
WANG L G,SHANG H S,JING J X. Screening and identification of wheat varieties varicties with high-temperature resistance to stripe rust[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica,1995,4(1):35-38.

[8] 李振声.小麦远缘杂交新品种:小偃6号[J].山西农业科学,1986,14(5):30.
LI Z S. Xiaoyan 6,a new distant hybrid wheat variety[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 1986,14(5):30.

[9] 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):43-47.
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):43-47.

[10] 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): 1314-1319.
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):1314-1319.

[11] 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.

[12] WANG J J,TAO F,AN F,et al. Wheat transcription factor TaWRKY70 is positively involved in high-temperature seedling plant resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*[J]. Molecular Plant Pathology,2017,18(5):649-661.

[13] 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.

[14] 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):1526-1535.

[15] 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):1325-1334.

[16] 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):249-267.

[17] 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):1449-1458.

[18] 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.

[19] 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):1241-1255.

[20] 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):1522-1534.

[21] HE G H,XU J Y,WANG Y X,et al. Drought-responsive WRKY transcription factor genes *TaWRKY1* and *TaWRKY33* from wheat confer drought and/or heat resistance in *Arabidopsis*[J]. BMC Plant Biology,2016,16(1):116.

[22] WANG N,TANG C,FAN X,et al. Inactivation of a wheat protein kinase gene confers broad-spectrum resistance to rust fungi[J]. Cell. 2022,185(16):2961-2974.

[23] HAMEL L P,NICOLE M C,SRITUBTIM S,et al. Ancient signals:comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families[J]. Trends in Plant Science, 2006, 11(4): 192-198.

[24] GAO M H,LIU J M,BI D L,et al. MEKK1,MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants[J]. Cell Research,2008,18(12):1190-1198.

[25] KONG Q,QU N,GAO M H,et al. The MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 kinase cascade negatively regulates immunity mediated by a mitogen-activated protein kinase kinase kinase in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell,2012,24(5):2225-2236.

[26] TAKAHASHI F,YOSHIDA R,ICHIMURA K,et al. The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell,2007,19(3):805-818.

[27] LIU T F,CAO L,CHENG Y Y,et al. MKK4/5-MPK3/6 cascade regulates *Agrobacterium*-mediated transformation by modulating plant immunity in *Arabidopsis*[J]. Frontiers in Plant Science,2021,12:731690.

[28] ZHANG J J,GAO J,ZHU Z,et al. MKK4/MKK5-MPK1/MPK2 cascade mediates SA-activated leaf senescence via phosphorylation of NPR1 in *Arabidopsis*[J]. Plant Molecular Biology,2020,102(4/5): 463-475.

[29] WANG S,HAN S Y,ZHOU X G,et al. Phosphorylation and ubiquitination of OsWRKY31 are integral to OsMKK10-2-mediated defense responses in rice[J]. The Plant Cell, 2023, 35(6):2391-2412.

[30] MA M M,WANG P,CHEN R B,et al. The OXIDATIVE SIGNAL-INDUCIBLE1 kinase regulates plant immunity by linking microbial pattern-induced reactive oxygen species burst to MAP kinase activation[J]. The Plant Cell, 2024, 37(1): koae311.

[31] LI G J,MENG X Z,WANG R G,et al. Dual-level regulation

of ACC synthase activity by MPK3/MPK6 cascade and its downstream WRKY transcription factor during ethylene induction in *Arabidopsis*[J]. PLoS Genetics，2012，8(6)：e1002767.

[32] MAO G H，MENG X Z，LIU Y D，et al. Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell，2011，23(4)：1639-1653.

[33] WANG D C，WEI L R，LIU T，et al. Suppression of ETI by PTI priming to balance plant growth and defense through an MPK3/MPK6-WRKYs-PP2Cs module[J]. Molecular Plant，2023，16(5)：903-918.

[34] MENG X Z，ZHANG S Q. MAPK cascades in plant disease resistance signaling[J]. Annual Review of Phytopathology，2013，51：245-266.

[35] ARNAIZ A，ROSA-DIAZ I，ROMERO-PUERTAS M C，et al. Nitric oxide，an essential intermediate in the plant-herbivore interaction[J]. Frontiers in Plant Science，2021，11：620086.

[36] PANDE A，MUN B G，LEE D S，et al. NO network for plant-microbe communication underground：a review[J]. Frontiers in Plant Science，2021，12：658679.

[37] MITTLER R，ZANDALINAS S I，FICHMAN Y，et al. Reactive oxygen species signalling in plant stress responses[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology，2022，23(10)：663-679.

[38] WANG R Y，HE F，NING Y S，et al. Fine-tuning of RBOH-mediated ROS signaling in plant immunity[J]. Trends in Plant Science，2020，25(11)：1060-1062.

[39] DELONG A，MOCKAITIS K，CHRISTENSEN S. Protein phosphorylation in the delivery of and response to auxin signals[J]. Plant Molecular Biology，2002，49(3/4)：285-303.

[40] XU J，ZHANG S Q. Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development[J]. Trends in Plant Science，2015，20(1)：56-64.

（责任编辑：陈丽）

（上接第 61 页）

[24] 荆蓉，彭祚登. 不同种源和树龄油松年高生长量的比较及主要气候影响因子分析[J]. 植物资源与环境学报，2021，30(5)：34-41，49.
JING R，PENG Z D. Comparison on annual height growth increment of *Pinus tabuliformis* of different provenances and tree ages and analysis on main climatic influencing factors[J]. Journal of Plant Resources and Environment，2021，30(5)：34-41，49.

[25] 周航宇，付琪瑶，梁婉婷，等. 天然油松叶-枝-根氮磷含量随降水和温度的变化规律[J]. 北京林业大学学报，2024，46(1)：44-54.
ZHOU H Y，FU Q Y，LIANG W T，et al. Changing patterns of nitrogen and phosphorus contents in leaf-branch-root of natural *Pinus tabuliformis* with precipitation and temperature[J]. Journal of Beijing Forestry University，2024，46(1)：44-54.

[26] 李德生，何安，彭玲，等. 重金属对日本樗木内渗透调节物质的影响[J]. 江苏农业科学，2018，46(1)：101-104.
LI D S，HE A，PENG L，et al. Effect of heavy metals on osmotic adjustment substances in *Aralia japonica*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences，2018，46(1)：101-104.

[27] 俎丽红，王鑫，王润玺，等. 不同大气环境中白皮松针叶重金属积累及抗性特征研究[J]. 农业环境科学学报，2017，36(11)：2207-2215.
ZU L H，WANG X，WANG R X，et al. Study on resistance characteristics to heavy metal accumulation of *Pinus bungeana* Zucc. needles from different atmospheric environments[J]. Journal of Agro-Environment Science，2017，36(11)：2207-2215.

[28] WYRWICKA A，URBANIAK M. The biochemical response of willow plants（*Salix viminalis* L.）to the use of sewage sludge from various sizes of wastewater treatment plant[J]. Science of the Total Environment，2018，615：882-894.

[29] 刘巧红，高宝嘉，陈晨. 不同林分类型油松针叶内生化物质的变化[J]. 西北农业学报，2012，21(10)：132-136.
LIU Q H，GAO B J，CHEN C. Variation of biochemical substances in Chinese pine（*Pinus tabulaeformis*）needles of different forest types[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica，2012，21(10)：132-136.

[30] 周晓声，娄厦，RADNAEVA L D，等. 植物对土壤重金属富集特性研究进展[J]. 生态毒理学报，2022，17(3)：400-410.
ZHOU X S，LOU X，RADNAEVA L D，et al. Advances in heavy metal accumulation characteristics of plants in soil[J]. Asian Journal of Ecotoxicology，2022，17(3)：400-410.

[31] 李少宁，孔令伟，鲁绍伟，等. 北京常见绿化树种叶片富集重金属能力研究[J]. 环境科学，2014，35(5)：1891-1900.
LI S N，KONG L W，LU S W，et al. Beijing common green tree leaves' accumulation capacity for heavy metals[J]. Environmental Science，2014，35(5)：1891-1900.

[32] 张玉秀，张凯，李金梅，等. 镍在植物体中的吸收转运机制[J]. 中国生态农业学报，2008，16(3)：778-782.
ZHANG Y X，ZHANG K，LI J M，et al. Absorption and transportation mechanism of nickel in plants[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture，2008，16(3)：778-782.

（责任编辑：陈丽）