

蛋白激酶 TaPiPK1 在小麦抗条锈病反应中的功能分析

冯伶杰[#], 张玲玉[#], 王晓东, 翟彤, 甘鹏飞,
汤春蕾, 康振生, 王晓杰^{*}

(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, 杨凌 712100)

摘要 由条形柄锈菌小麦专化型 *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Pst) 引起的条锈病, 长期严重威胁小麦安全生产。Pst 通过毒性变异产生新毒性小种或致病类型, 能克服生产上已应用的抗病基因, 导致抗病品种感病。因此, 挖掘抗条锈病基因资源对小麦抗病遗传改良和加快抗病新品种培育具有重要意义。蛋白激酶在应答病原菌侵染, 传递植物免疫信号中发挥重要作用。本研究通过小麦转录组数据分析, 筛选到参与应答 Pst、小麦白粉菌 *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* 和赤霉病菌 *Fusarium graminearum* 侵染的蛋白激酶基因 TaPiPK1。该蛋白激酶基因编码 551 个氨基酸, C 末端含有一个 STK 激酶结构域。利用 RT-qPCR 检测发现, TaPiPK1 在小麦与条锈菌非亲和互作的前期上调表达; TaPiPK1 主要定位于细胞质与细胞膜。利用大麦条纹花叶病毒介导的基因沉默技术 (BSMV-VIGS) 瞬时沉默 TaPiPK1, 显著降低小麦 ‘水源 11’ 对条锈菌非亲和小种 CYR23 的抗性, 表明 TaPiPK1 参与小麦抗条锈病反应并发挥重要作用。因此, TaPiPK1 有可能作为潜在的基因资源用于小麦抗条锈病育种。

关键词 小麦; 条锈病; 蛋白激酶; 病毒诱导的基因沉默; 广谱抗性

中图分类号: S 435.121.42 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbl.2022172

Functional analysis of protein kinase TaPiPK1 in wheat resistance response to stripe rust

FENG Lingjie[#], ZHANG Lingyu[#], WANG Xiaodong, ZHAI Tong, GAN Pengfei,
TANG Chunlei, KANG Zhensheng, WANG Xiaojie^{*}

(State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract Wheat stripe rust, caused by *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Pst), is a serious threat to wheat production. Pst frequently produces new virulent races or pathogenic types overcoming the disease-resistant genes applied in wheat production through frequent virulence variation, subsequently leading to the susceptibility of resistant varieties to diseases. Therefore, excavating genetic resources of resistance is of great significance for the genetic improvement of wheat disease resistance and accelerating disease-resistance breeding. Protein kinases play an important role in the transmission of plant immune signals in response to pathogen infection. In this study, a protein kinase gene *TaPiPK1* involved in response to Pst, *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* and *Fusarium graminearum* was identified by analyzing wheat transcriptome data. *TaPiPK1* encoded 551 amino acids, and contained a serine-threonine kinase domain at C-terminal. RT-qPCR results showed that the expression of *TaPiPK1* was upregulated in the early stage of incompatible interaction between wheat and Pst. Subcellular localization revealed that *TaPiPK1* was mainly localized in cytoplasm and cell membrane. Transient silencing of *TaPiPK1* by barley stripe mosaic virus-mediated gene silencing technique (BSMV-VIGS) significantly reduced the resistance of wheat ‘Suwon 11’ to Pst CYR23, indicating that *TaPiPK1* plays an important role in wheat stripe rust resistance. Therefore, *TaPiPK1* may be a potentially important gene resource for breeding for stripe rust resistance in wheat.

Key words wheat; stripe rust; protein kinase; VIGS; broad-spectrum resistance

收稿日期: 2022-04-01 修订日期: 2022-05-09

基金项目: 陕西省创新人才推进计划——科技创新团队(2018TD-004)

* 通信作者 E-mail: wangxiaojie@nwauf.edu.cn

为并列第一作者

条锈病是我国小麦生产上的主要病害之一,其病原菌是条形柄锈菌小麦专化型 *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Pst)^[1]。病原菌夏孢子能够随气流远距离传播,危害范围广,造成小麦 5%~25% 产量损失,对我国粮食安全构成严重威胁^[2]。种植抗条锈病品种是最经济有效的病害防控策略。然而,条锈菌群体频繁发生毒性变异导致小麦品种丧失抗病性^[2-3]。挖掘抗病新基因资源对于小麦条锈病的可持续防控具有重要意义。

蛋白激酶超家族主要由丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶和酪氨酸特异性蛋白激酶组成,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶是生物体中重要的蛋白激酶家族,参与植物体内蛋白磷酸化,在信号传递中起着重要作用^[4]。据研究,玉米^[5-6]、水稻^[7]、大豆^[8]以及小麦^[9-10]等多种植物的蛋白激酶参与干旱、盐及生物胁迫反应等多种信号传递途径。小麦基因组编码超过 4 000 个蛋白激酶基因,包括丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、类受体激酶(RLK)、细胞质受体类激酶(RLCK)等多种类型,在调控小麦生长发育及应答各种环境胁迫中发挥着重要作用^[11]。MAPK 含有典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域,其级联反应是高度保守的信号传导模块,参与调节植物生长发育及应对生物及非生物胁迫^[12]。另外,一些抗病基因如水稻抗白叶枯病基因 *Xa21*^[13]、小麦抗叶锈病基因 *Lr10*^[14]、大麦抗秆锈病基因 *Rpg1*^[15]和番茄抗细菌性斑点病基因 *Pto*^[16]编码的抗病蛋白都含有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域,属于类受体激酶,在植物抗病反应中发挥重要作用。

本研究通过分析小麦与条锈菌互作过程的转录组数据,筛选到受条锈菌侵染诱导上调表达的蛋白激酶基因 *TaPiPK1*。利用 RT-qPCR 分析了 *TaPiPK1* 在小麦-条锈菌互作过程中的表达特征,并利用 VIGS 技术分析了 *TaPiPK1* 在小麦抗条锈病反应中的功能,以期为小麦抗病遗传改良提供新基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料及培养条件:小麦品种‘水源 11’,培养温度为 16~20°C;本氏烟 *Nicotiana benthamiana*,培养温度为 25~28°C。光周期 L//D=16 h//8 h。

菌株材料:小麦条锈菌小种条中 23 号(CYR23),工程菌株大肠杆菌 DH5α,农杆菌 GV3101。

质粒载体: pCAMBIA1302 用于亚细胞定位表达载体构建;课题组保存的大麦条纹花叶病毒(bar-

ley stripe mosaic virus, BSMV) BSMV:α、BSMV:β、BSMV:γ 载体,用于 VIGS 瞬时沉默试验。

1.2 试验方法

1.2.1 *TaPiPK1* 克隆及序列分析

通过 NCBI 数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中的 BLAST 工具比对得到 *TaPiPK1* 全长序列。利用 Primer Premier 5.0 设计 *TaPiPK1* 扩增引物(*TaPiPK1-F* 和 *TaPiPK1-R*,序列见表 1)并由北京擎科生物公司合成,以‘水源 11’总 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。扩增程序为: 98°C 5 min; 98°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 10 min。回收目的片段并测序。利用 NCBI 数据库和 Ensembl (<https://plants.ensembl.org/Multi/Tools/Blast>) 在线数据库对测序序列进行比对进行分析。使用 WheatOmics 1.0 (<http://wheatomics.sdau.edu.cn/expression/index.html>) 的转录组数据分析了 *TaPiPK1* 在病原菌诱导和高温等胁迫下的基因表达情况。利用 DeepLoc 2.0、CBS-TMHMM 和 CBS-signal 等在线工具预测 *TaPiPK1* 的亚细胞定位、跨膜结构域及信号肽等信息。

1.2.2 *TaPiPK1* 表达模式分析

分析 *TaPiPK1* 特异性序列,设计引物 (*TaPiPK1-qRT-F* 和 *TaPiPK1-qRT-R*);以小麦延伸因子 *TaEF-1α* 基因为内参基因^[17],以接种条锈菌 CYR23 后不同时间点制备的小麦叶片 cDNA 为模板,使用 Vazyme 公司的染料法荧光定量 Mix,进行 qPCR 扩增。反应体系为: 2×ChamQ SYBR qPCR Master Mix 10 μL, *TaPiPK1-qRT-F* (10 μmol/L) 0.4 μL, *TaPiPK1-qRT-R* (10 μmol/L) 0.4 μL, 小麦各时间点 cDNA 2 μL, ddH₂O 补足至 20 μL。反应程序为: 95°C 30 s; 90°C 10 s, 60°C 30 s, 40 个循环; 95°C 10 s, 60°C 60 s, 95°C 15 s。每个处理样本进行 3 次重复,确定溶解曲线和荧光变化曲线正常,利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算不同时间点目的基因的相对表达量^[18]。

1.2.3 *TaPiPK1* 亚细胞定位

根据 *TaPiPK1* 的 CDS 序列(去终止子)设计引物 (*TaPiPK1-pCAMBIA1302-F* 和 *TaPiPK1-pCAMBIA1302-R*),PCR 扩增获得的基因片段连接到携带 GFP 标签的 pCAMBIA1302 载体上,构建 *TaPiPK1:GFP* 融合表达载体。将融合表达载体转入农杆菌 GV3101 感受态细胞中,扩大培养阳性克隆,4 000 r/min 离心收集菌体,利用 10 mmol/L 的 MgCl₂ 溶液清洗 3 次,用乙酰丁香酮缓冲液[含 10 mmol/L MgCl₂, 10 μmol/L 乙酰丁香酮 (AS),

10 mmol/L 2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES), pH 5.6]重悬菌体并稀释至 OD₆₀₀ = 0.3, 置于黑暗条件下 1 h, 用于烟草注射。选取生长 3~4 周的本生烟叶片进行农杆菌注射。注射 48 h 后, 在激光共聚焦显微镜(Olympus FV3000)下观察融合蛋白表达情况及其在细胞内的分布。用液氮将观察到荧光的烟草叶片研磨成粉状, 使用 Beyotime 公司的植物 Western 及 IP 细胞裂解液试剂盒提取烟草叶片蛋白, 进行 Western blot 检测。

1.2.4 大麦条形花叶病毒介导的 *TaPiPK1* 基因沉默

大麦条形花叶病毒(BSMV)介导的 VIGS 技术已被广泛应用于小麦基因功能研究, 该技术体系包含 BSMV: α、BSMV: β 和 BSMV: γ 3 个载体。将 100~300 bp 的靶标片段连接到 BSMV: γ 载体上,

通过与 BSMV: α、BSMV: β 进行病毒重组可以有效地将靶标基因瞬时沉默^[19]。本研究利用 NCBI 的 Blastn 工具分析 *TaPiPK1* 的同源序列并选取 *TaPiPK1* 特有的 300 bp 核苷酸片段, 设计引物(*TaPiPK1-γ-F* 和 *TaPiPK1-γ-R*, 序列见表 1)扩增并回收扩增片段。利用一步克隆法将目的片段构建至经 *PacI* 和 *NotI* 双酶切的 BSMV: γ 载体上, 得到 BSMV: γ-*TaPiPK1* 质粒。利用 *BssHII* 对 BSMV: γ-*TaPiPK1*、BSMV: γ-PDS 质粒进行酶切线性化; 利用 *MluI* 对 BSMV: α、BSMV: γ 质粒进行酶切线性化; 利用 *SpeI* 对 BSMV: β 质粒进行酶切线性化。以相同浓度的线性化产物为模板, 利用 RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems-T7 试剂盒(Promega, 美国)进行体外转录, 凝胶电泳检测后, 剩余产物用 DEPC 水稀释备用。

表 1 用于 *TaPiPK1* 克隆和功能分析的引物

Table 1 Primers for *TaPiPK1* cloning and functional analysis

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence	扩增产物 大小/bp Product size	退火温度/℃ Annealing temperature	用途 Purpose
TaPiPK1-F	ATGGAGGCTGTCCGTATCTACTG	1 653	58	基因克隆
TaPiPK1-F	CACGGTGAGGCCGATGATGTTTATC			
TaPiPK1-pCAMBIA1302-F	GGGACTCTTGACCATGGTA			
TaPiPK1-pCAMBIA1302-R	ATGGAGGCTGTCCGTATCTACTG	1 691	60	烟草亚细胞定位
	TCACCATCCTAGGACTAGT			
	CACGGTGAGGCCGATGATGTTTATC			
TaPiPK1-γ-F	TAGCTAGCTGATTAATTAA ATGGAGGCTGTCCGTATCTACTG	320	60	BSMV 介导的 基因沉默
TaPiPK1-γ-R	TTGCTAGCTGAGCGGCCGC CTTGAATGGGATGAAGACCCCT			
TaEF-1α-F	TGGTGTCACTCAAGCCTGGTATGGT	85	58	内参基因
TaEF-1α-R	ACTCATGGTCATCTCAACGGACT			
TaPiPK1-qRT-F	CCGGCTCTGAGAAGATTATGGT	170	58	表达特征 分析
TaPiPK1-qRT-R	ACGGTGAGGCCGATGATGTTTAT			

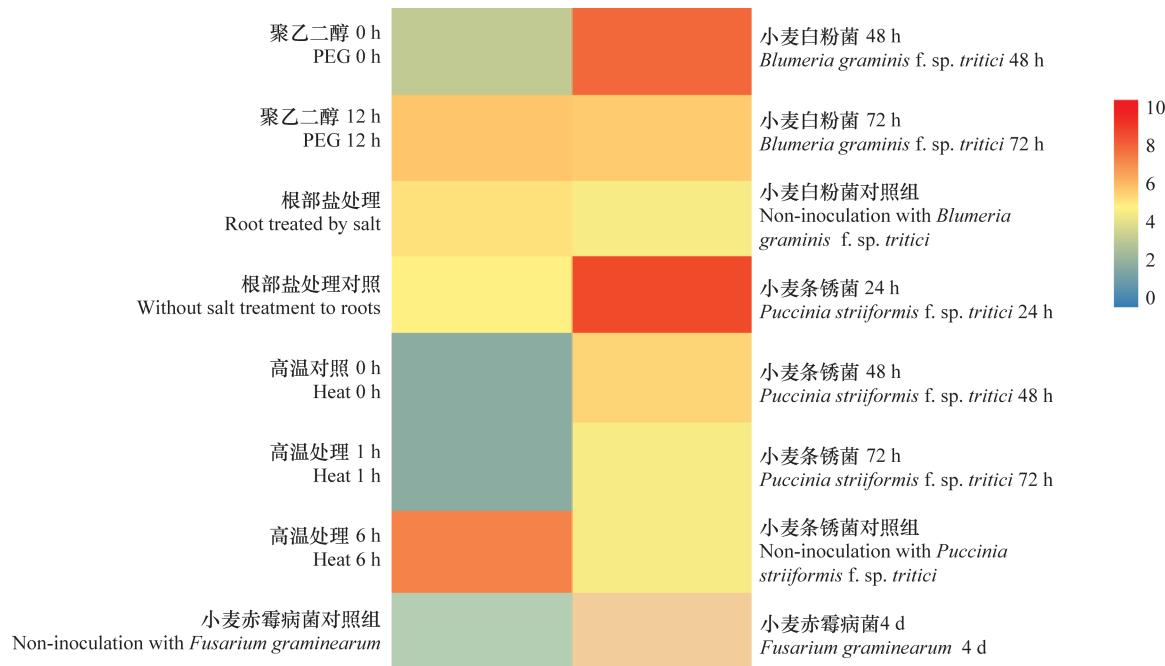
取体外转录好的 BSMV: α、BSMV: β 各 0.5 μL 分别与 0.5 μL 的 BSMV: γ-PDS、BSMV: γ 和 BSMV: γ-*TaPiPK1* 按 1:1:1 的体积比混合, 再加入 FES buffer(2.613 g 磷酸氢二钾, 1.877 g 甘氨酸, 0.5 g 焦磷酸钠, 0.5 g 硅藻土, 0.5 g 斑脱土, 定容至 50 mL 高温蒸汽灭菌后使用)混匀。将小麦品种‘水源 11’在 16°C 条件下培养至两叶一心期。通过涂抹的方式将重组病毒接种到小麦的第二叶。八氢番茄红素脱氢酶基因 *PDS* 是叶绿素合成中的重要基因, 缺失后会导致植物出现光漂白现象, 试验中将单独涂抹 FES buffer 的植物作为阴性对照, 将接种 BSMV: γ-PDS 的植株作为病毒接种的阳性对照, 以判断病毒接种是否成功^[20]。接种 2 周后观察到接种 BSMV: γ-PDS 的小麦植株第 3 叶出现光漂白现象后, 将接种 BSMV: γ-*TaPiPK1* 和空载体对照(BSMV: γ)的植株第 4 叶分别接种条锈菌 CYR23, 在 0、24、48、120 h 后分别取接

种条锈菌的叶片作为样本, 用于组织学观察和基因表达分析。接种 14 d 后观察表型, 统计发病情况。利用 WGA-Alex 488 荧光染料对叶片中的条锈菌菌丝进行染色, 在荧光显微镜下观察、统计菌丝的发育情况^[17]。

2 结果与分析

2.1 *TaPiPK* 基因的克隆和序列分析

TaPiPK1 的 CDS 序列包含 1 656 个碱基, 编码 551 个氨基酸, 含有保守的 STK 激酶结构域, 无信号肽和跨膜区域, 预测 *TaPiPK1* 定位于细胞质中。利用 WheatOmics 1.0 对 *TaPiPK1* 在多种胁迫下转录组数据进行分析^[21-24], 结果表明 *TaPiPK1*(Ensemble plant 中的登录号为 TraesCS7B02G255500)的表达受 Pst、赤霉菌 *Fusarium graminearum* 和白粉菌 *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* 等病菌的诱导, 同时也受干旱、高盐、高温等非生物胁迫的诱导(图 1)。



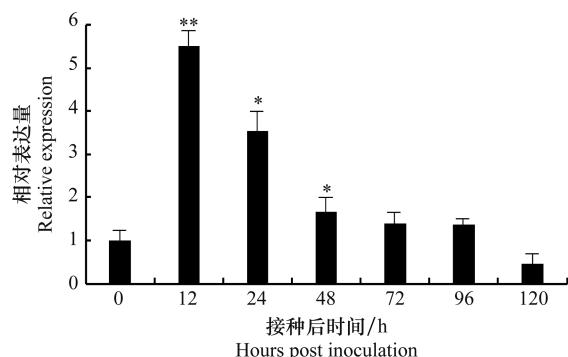
图中每个格子表示不同处理, 0~10的颜色差别表示TaPiPK1相对表达量的差异, 根部盐处理为150 mmol/L NaCl, 高温条件为40℃。Each cell in the grid chart represents one treatment, and the color difference ranged from 0 to 10 represents the difference in the relative expression of TaPiPK1. The root salt treatment is 150 mmol/L NaCl, and the high temperature condition is 40℃。

图 1 TaPiPK1 在不同病原菌诱导和非生物胁迫下的小麦转录组数据分析

Fig. 1 Transcriptome data analysis of TaPiPK1 induced by different pathogens and abiotic stresses in wheat

2.2 TaPiPK1 在条锈菌侵染过程中的表达特征

RT-qPCR结果显示,在条锈菌与小麦的非亲和互作中,TaPiPK1主要在病原菌侵染后12、24 h和48 h表达,在接种后12 h相对表达量约为0 h的5倍,达到表达量的峰值(图2)。推测TaPiPK1可能在小麦应答条锈菌侵染早期发挥作用。



以TaEF-1 α 为内参基因。* 和 ** 分别表示经t测验与0 h相比差异显著($P<0.05$)和差异极显著($P<0.01$)。

TaEF-1 α was used as the internal reference gene. * and ** indicate significant difference ($P<0.05$) and extremely significant difference ($P<0.01$) compared to 0 h based on Student's t -test.

图 2 TaPiPK1 在小麦品种‘水源 11’与条锈菌 CYR23 互作过程中的表达谱分析

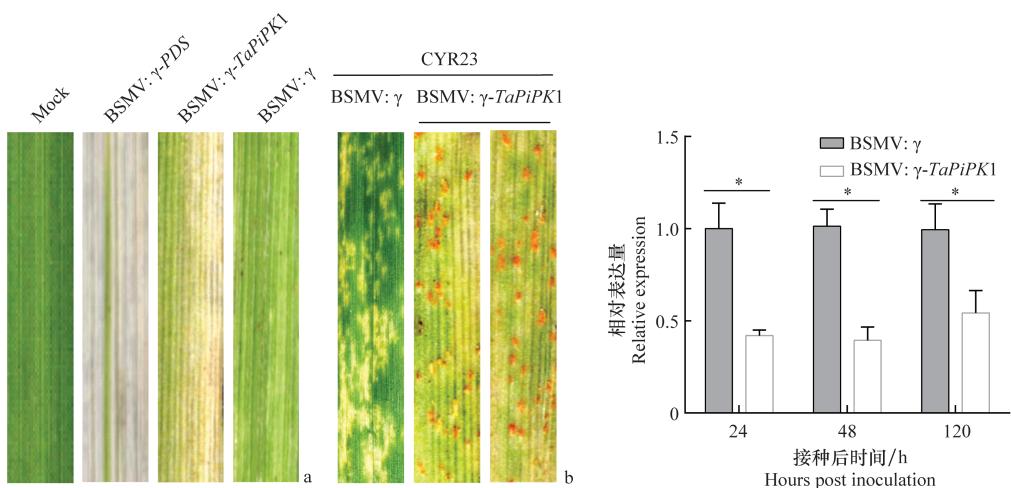
Fig. 2 Expression profiles of TaPiPK1 in the incompatible interaction between wheat ‘Suwon 11’ and Pst CYR23

2.3 瞬时沉默 TaPiPK1 减弱了小麦对条锈菌的抗性

接种病毒后10~12 d, 接种BSMV: γ -PDS的小麦植株出现光漂白现象, 接种BSMV: γ -TaPiPK1、BSMV: γ 的植株均出现明显的病毒症状, 表明病毒接种成功(图3a)。接种条锈菌CYR23后14 d, 发现接种BSMV: γ 的叶片出现典型的过敏性坏死反应, 无夏孢子堆, 而沉默TaPiPK1的植株产生了少量夏孢子堆(图3b)。利用RT-qPCR技术分别对条锈菌侵染24、48 h和120 h后TaPiPK1的表达量进行检测发现, 与接种BSMV: γ 植株相比, 接种BSMV: γ -TaPiPK1植株中TaPiPK1的表达量显著降低, 在24、48 h和120 h分别减少58.1%、61.4%、45.3%, 表明TaPiPK1被有效沉默(图3c)。以上结果表明沉默TaPiPK1减弱了小麦的抗病性, 正调控小麦抗条锈菌反应。

2.4 沉默 TaPiPK1 促进了条锈菌在小麦叶片中的发育

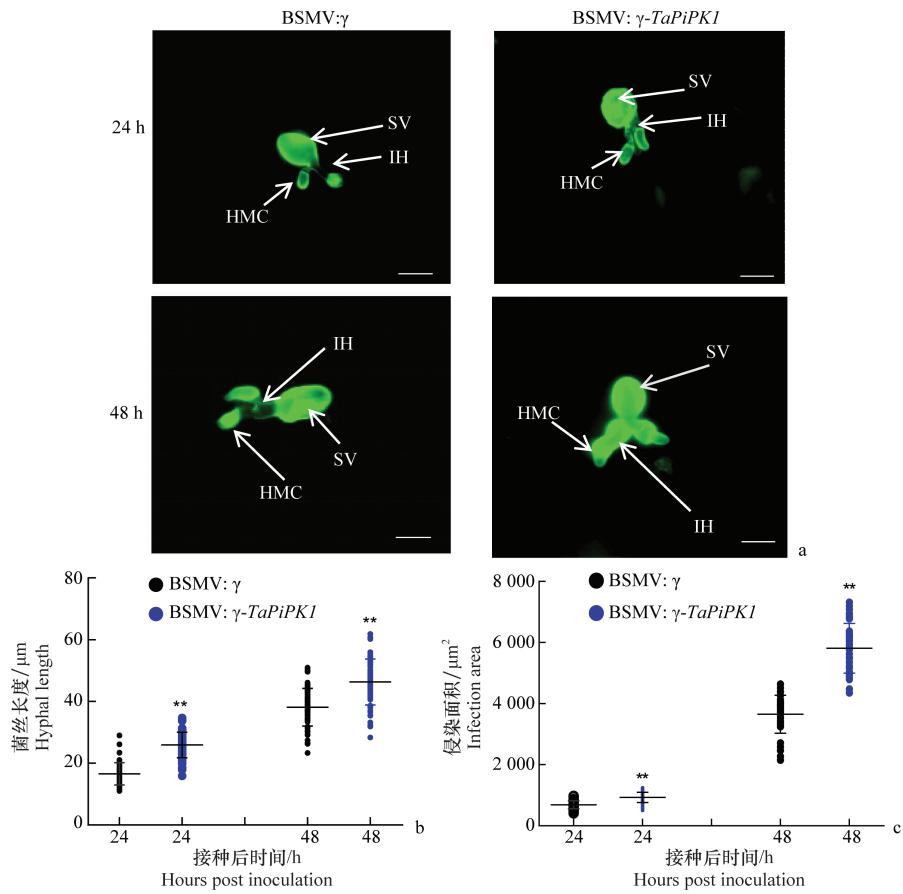
利用组织学观察条锈菌菌丝生长发育情况, 发现在24 h和48 h, TaPiPK1沉默叶片中条锈菌侵染菌丝长度显著大于对照, 菌丝扩展面积也显著大于对照叶片(图4)。沉默TaPiPK1促进了小麦叶片中条锈菌的生长发育(图4)。



Mock: 未处理的对照植株; BSMV: γ-PDS: 瞬时沉默PDS基因的植株; BSMV: γ-TaPiPK1: 瞬时沉默TaPiPK1基因的植株; BSMV: γ: 进行瞬时沉默处理的对照植株。a: ‘水源11’小麦接种大麦条纹花叶病毒的表型鉴定; b: 大麦条纹花叶病毒介导的基因沉默植株接种CYR23后的表型鉴定。*表示经t测验处理组与对照组差异显著($P<0.05$)。

Mock: Untreated control plants; BSMV: γ-PDS: Transient silencing of *PDS* in plants; BSMV: γ-TaPiPK1: Transient silencing of *TaPiPK1* in plants; BSMV: γ: Control plants treated with instantaneous silencing. a: Phenotypic identification of wheat ‘Suwon 11’ inoculated with BSMV; b: Phenotypic identification of BSMV-infected wheat inoculated with Pst race CYR23; c: Silencing efficiency of *TaPiPK1* in BSMV-infected wheat after inoculated with Pst race CYR23. * indicates the significant difference between the treatment and control group ($P<0.05$) based on Student’s *t*-test.

图 3 TaPiPK1 在小麦品种‘水源 11’与条锈菌非亲和小种 CYR23 互作中的功能分析
Fig. 3 Functional analysis of *TaPiPK1* in the interaction between wheat ‘Suwon 11’ and Pst CYR23



a: WGA-Alex 488染色的Pst菌丝发育情况(SV: 气孔下囊; HMC: 吸器母细胞; IH: 侵染菌丝。标尺=20 μm); b: 接种 CYR23后24 h和48 h的菌丝长度; c: 接种 CYR23后24、48 h的Pst侵染面积。**表示经t测验处理组与对照组BSMV: γ差异极显著($P<0.01$)。

a: Development of Pst hypha stained by WGA-Alex 488 (SV: Substomatal vesicle; HMC: Haustorial mother cell; IH: Infection hypha. Bar=20 μm); b: Hyphal length 24 h and 48 h after inoculation with CYR23; c: Infection area of Pst 24 h and 48 h after inoculation with Pst CYR23. ** indicates extremely significant difference between treatment and the BSMV: γ control group ($P<0.01$) based on Student’s *t*-test.

图 4 小麦条锈菌在瞬时沉默 TaPiPK1 小麦叶片中的发育情况
Fig. 4 Development of Pst hypha in *TaPiPK1* transiently silenced wheat leaves

2.4 TaPiPK1 亚细胞定位分析

为了探究 TaPiPK1 发挥作用的部位,利用农杆菌介导的瞬时表达技术将 TaPiPK1:GFP 融合载体在烟草中瞬时表达,以只表达 GFP 的叶片为对照,显微镜观察发现 TaPiPK1:GFP 绿色荧光主要分布

于烟草细胞的细胞膜和细胞质(图 5a)。为了确定 TaPiPK1:GFP 和 GFP 是否正确表达,提取对应烟草叶片总蛋白进行 Western blot 分析,结果分别检测到 75 kD 及 25 kD 的条带,与目的蛋白分子量一致,证明蛋白在烟草中正确表达(图 5b)。

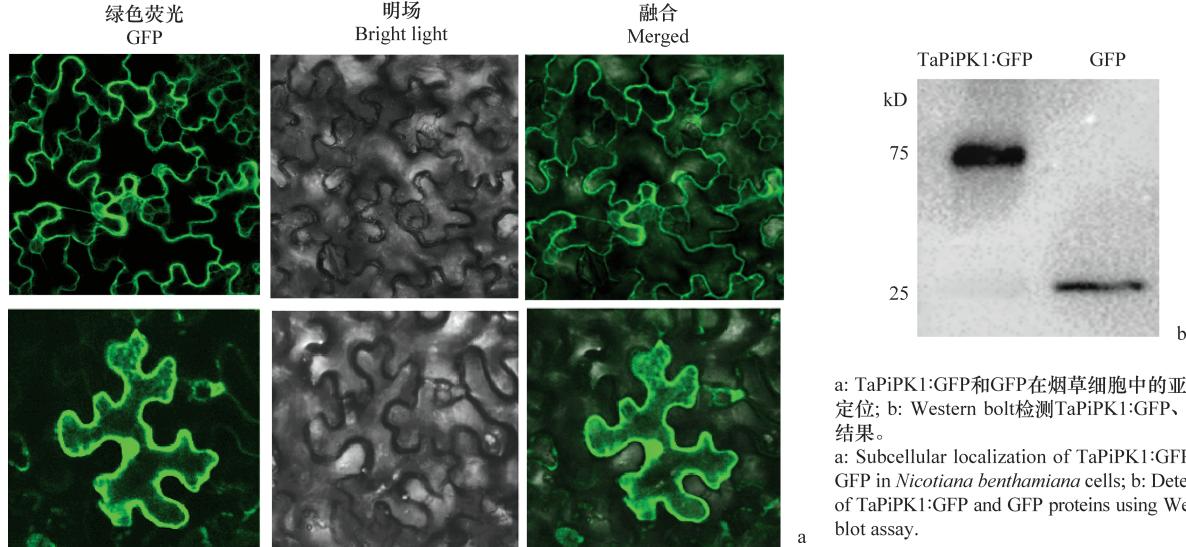


图 5 TaPiPK1 在烟草细胞的亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of TaPiPK1 in *Nicotiana benthamiana* cells

3 结论与讨论

在条锈菌侵染小麦过程中,夏孢子萌发形成的芽管侵入气孔,形成气孔下囊和初生菌丝,初生菌丝向叶肉细胞侵染形成吸器母细胞,在侵染 12~24 h 产生大量吸器^[25~26]。吸器是条锈菌从寄主吸取营养的特化结构,也是条锈菌向小麦分泌效应蛋白抑制小麦免疫的重要结构。因此,吸器形成时期是决定条锈菌能否成功定殖的关键时期,也是小麦防卫反应最强烈的时期。在非亲和互作中, TaPiPK1 在条锈菌侵入小麦 12 h 和 24 h 显著上调表达,表明 TaPiPK1 可能在这一关键时期发挥作用。

研究发现一些抗病基因具有激酶结构域,小麦抗条锈基因 Yr36 编码的抗病蛋白含有激酶结构域,在高温下介导对多个条锈菌系的广谱抗性^[27];小麦抗赤霉病基因 WAK2 编码一类细胞壁受体激酶,可以有效调控对于赤霉病的抗性^[28];小麦叶枯病抗病基因 STB6 编码一个富含半胱氨酸的受体激酶,对携带 AvrStb6 基因的菌株具有基因对基因类型的抗

性^[29]。另外,一些类受体激酶或胞内蛋白激酶在调控小麦的抗病中也发挥重要作用^[30]。TaCRK3 是富含半胱氨酸类受体蛋白激酶,通过基因沉默发现其具有抗真菌活性,并能够调控乙烯信号通路中防御相关基因表达从而介导小麦对禾谷镰孢 *Fusarium graminearum* 的抗性^[31]。在小麦中 TaRLCK1B 属于第Ⅷ亚家族的类受体胞质激酶,正调控小麦对小麦纹枯病的抗性,在抗性品种中的表达水平显著高于感病品种^[32]。在簇毛麦 *Dasyphryum villosum* 中鉴定到的 RLK-V 蛋白激酶能够调节小麦对白粉病的基础抗性^[33]。本研究通过基因沉默试验发现 TaPiPK1 正调控小麦对条锈病的抗性。小麦抗病基因 STB6 在叶枯病菌 *Zymoseptoria tritici* 诱导后 24 h 上调表达^[29], TaRLCK1B 受小麦纹枯病菌 *Rhizoctonia cerealis* 诱导后 24 h 和 48 h 上调表达^[32],与这两个基因类似, TaPiPK1 在条锈菌侵染前期上调表达。另外, TaPiPK1 与 STB6、TaCRK3 等抗病相关蛋白激酶均定位于细胞质和细胞膜,表明其发挥作用的位置是类似的。不同的是,转录组分析发现 TaPiPK1 响应条锈病、白粉病、赤霉病等

多种病害以及干旱、高温、高盐等非生物胁迫，推测 *TaPiPK1* 可能在小麦应对生物胁迫、非生物胁迫中发挥一定的作用，有可能作为小麦遗传改良中兼具广谱抗病性及抗逆性的候选基因。

参考文献

- [1] WAN Anmin, ZHAN Zhonghua, CHEN Xianmin, et al. Wheat stripe rust epidemic and virulence of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [J]. Plant Disease, 2004, 88(8): 896–904.
- [2] 康振生, 王晓杰, 赵杰, 等. 小麦条锈菌致病性及其变异研究进展[J]. 中国农业科学, 2015, 48(17): 3439–3453.
- [3] TIAN Yuan, ZHAN Gangming, CHEN Xianmin, et al. Virulence and simple sequence repeat marker segregation in a *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* population produced by selfing a Chinese isolate on *Berberis shensiiana* [J]. Phytopathology, 2016, 106(2): 185–191.
- [4] ZHANG Li, TAKAHASHI Y, SCHROEDER J I. Protein kinase sensors: an overview of new designs for visualizing kinase dynamics in single plant cells [J]. Plant Physiology, 2021, 187(2): 527–536.
- [5] WALKER J C, ZHANG Ren. Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoproteins of *Brassica* [J]. Nature, 1990, 345(627): 743–746.
- [6] 邹晓威, 王娜, 刘芬, 等. 玉米抗病相关基因在玉米与玉米丝黑穗病菌、玉米黑粉病菌互作过程中的表达差异分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 150–152.
- [7] MA Haiguang, LI Juan, MA Ling, et al. Pathogen-inducible OsMPK10, 2-OsMPK6 cascade phosphorylates the Raf-like kinase OsEDR1 and inhibits its scaffold function to promote rice disease resistance [J]. Molecular Plant, 2021, 14(4): 620–632.
- [8] ZHANG Chunbao, ZHAO Hongkun, LIU Yanzhi, et al. Isolation and characterization of a novel glycogen synthase kinase gene, *GmGSK* in *Glycine max* L. that enhances abiotic stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(6): 861–866.
- [9] 赵婉莹. 普通小麦钙依赖蛋白激酶基因 *TaCDPK1* 的抗旱功能研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [10] 王晓杰. 小麦与条锈菌互作机理研究及抗条锈相关基因的功能分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009.
- [11] WEI Kaifa, LI Yixuan. Functional genomics of the protein kinase superfamily from wheat [J]. Molecular Breeding, 2019, 39(11): 1–23.
- [12] JIANG Min, CHU Zaoqing. Comparative analysis of plant MKK gene family reveals novel expansion mechanism of the members and sheds new light on functional conservation [J/OL]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 407. DOI: 10.1186/s12864-018-4793-8.
- [13] SONG Wenyuan, WANG Guoliang, CHEN Lili, et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21* [J]. Science, 1995, 270(5243): 1804–1806.
- [14] FEUILLET C, SCHACHERMAYR G, KELLER B. Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encoded at the *Lr10* disease resistance locus of wheat [J]. Plant Journal, 1997, 11(1): 45–52.
- [15] BRUEGGEMAN R, ROSTOKS N, KUDRNA D, et al. The barley stem rust-resistance gene *Rpg1* is a novel disease-resistance gene with homology to receptor kinases [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(14): 9328–9333.
- [16] MARTIN G B, BROMMONSCHENKEL S H, CHUN-WONGSE J, et al. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato [J]. Science, 1993, 262(5138): 1432–1436.
- [17] 许强. 小麦条锈菌效应蛋白 *Pst_A23* 调控植物 pre-mRNA 可变剪切抑制植物免疫[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2020.
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [19] SCOFIELD S R, HUANG L, BRANDT A S, et al. Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the *Lr21*-mediated leaf rust resistance pathway [J]. Plant Physiology, 2005, 138(4): 2165–2173.
- [20] HOLZBERG S, BROSIO P, GROSS C, et al. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant [J]. The Plant Journal, 2002, 30(3): 315–327.
- [21] PFEIFER M, KUGLER K G, SANDVE S R, et al. Genome interplay in the grain transcriptome of hexaploid bread wheat [J/OL]. Science, 2014, 345(6194): 1250091. DOI: 10.1126/science.1250091.
- [22] ZHANG Hong, YANG Yongzheng, WANG Changyou, et al. Large scale transcriptome comparison reveals distinct gene activations in wheat responding to stripe rust and powdery mildew [J/OL]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 898. DOI: 10.1186/1471-2164-15-898.
- [23] AMIRBAKHTIAR N, ISMAILI A, GHAFARI M R, et al. Transcriptome response of roots to salt stress in a salinity-tolerant bread wheat cultivar [J/OL]. PLoS ONE, 2019, 14(3): e0213305. DOI: 10.1371/journal.pone.0213305.
- [24] LIU Zhenshan, XIN Mingming, QIN Jinxia, et al. Temporal transcriptome profiling reveals expression partitioning of homologous genes contributing to heat and drought acclimation in wheat [J/OL]. BMC Plant Biology, 2015, 15: 152. DOI: 10.1186/s12870-015-0511-8.

(下转 84 页)

- $2^{-\Delta\Delta CT}$ methods [J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [23] CHEN Xiulin, LI Boliao, CHEN Yuxin, et al. Functional analysis of the odorant receptor coreceptor in odor detection in *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) [J/OL]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2021, 108(2): e21837. DOI: 10.1002/arch.21837.
- [24] LEAL W S. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes [J]. Annual Review of Entomology, 2013, 58: 373–391.
- [25] LEGEAI F, MALPEL S, MONTAGNÉ N, et al. An expressed sequence tag collection from the male antennae of the Noctuid moth *Spodoptera littoralis*: a resource for olfactory and pheromone detection research [J/OL]. BMC Genomics, 2011, 12(1): 86. DOI: 10.1186/1471-2164-12-86.
- [26] ANDERSON A R, WANNER K W, TROWELL S C, et al. Molecular basis of female-specific odorant responses in *Bombyx mori* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 39(3): 189–197.
- [27] 刘程程, 刘杨, 张进, 等. 甜菜夜蛾触角气味受体基因OR18的克隆和表达定位[J]. 中国农业科学, 2013, 46(20): 4263–4271.
- [28] ZHANG Jin, LIU Chengcheng, YAN Shuwen, et al. An odorant receptor from the common cutworm (*Spodoptera litura*) exclusively tuned to the important plant volatile *cis*-3-hexenyl acetate [J]. Insect Molecular Biology, 2013, 22(4): 424–432.
- [29] 孔畅仪, 王桂荣, 刘杨, 等. 小菜蛾三个普通气味受体基因的克隆及表达谱[J]. 中国农业科学, 2014, 47(9): 1735–1742.
- [30] 张帅, 张永军, 苏宏华, 等. 棉铃虫气味受体的克隆与组织特异性表达[J]. 昆虫学报, 2009, 52(7): 728–735.
- [31] 马龙, 王山宁, 路子云, 等. 中红侧沟茧蜂嗅觉受体 *MmedOr2* 基因的克隆及组织表达谱[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(1): 13–19.
- [32] 陈丽慧, 李梅梅, 陈秀琳, 等. 梨小食心虫普通气味受体基因 *GmolOR20* 的克隆及表达分析[J]. 昆虫学报, 2019, 62(4): 418–427.
- [33] 张国辉, 仵均祥. 梨小食心虫成虫行为节律研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(12): 131–135.
- [34] 白鹏华, 王冰, 张仙红, 等. 昆虫气味受体的研究方法与进展[J]. 昆虫学报, 2022, 65(3): 364–385.
- [35] 路艺, 王倩, 温俊宝. 基于沟眶象属两近缘种不同虫态转录组的气味受体基因鉴定及表达分析[J]. 昆虫学报, 2021, 64(6): 655–665.
- [36] 王建国, 王建军, 曹传旺, 等. 舞毒蛾 *LdOR2* 基因克隆及对 CO_2 胁迫下的行为反应[J]. 北京林业大学学报, 2021, 43(9): 101–110.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 38 页)

- [25] 康振生, 李振岐, J 庄约兰, 等. 小麦条锈菌吸器超微结构和细胞化学的研究[J]. 真菌学报, 1994(1): 52–57.
- [26] 康振生. 植物病原真菌的超微结构[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1995.
- [27] FU Daolin, UAUY C, DISTELFELD A, et al. A kinase-START gene confers temperature-dependent resistance to wheat stripe rust [J]. Science, 2009, 323(5919): 1357–1360.
- [28] GADALETA A, COLASUONNO P, GIOVE S L, et al. Map-based cloning of *QFhb. mgb-2A* identifies a *WAK2* gene responsible for Fusarium head blight resistance in wheat [J/OL]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 6929. DOI: 10.1038/s41598-019-43334-z.
- [29] SAINTENAC C, CAMBON F, AOUINI L, et al. A wheat cysteine-rich receptor-like kinase confers broad-spectrum resistance against *Septoria tritici* blotch [J/OL]. Nature Communications, 2021, 12(1): 433. DOI: 10.1038/s41467-020-20685-0.
- [30] 王晓杰, 甘鹏飞, 汤春蕾, 等. 植物抗病性与病害绿色防控: 主要科学问题及未来研究方向[J]. 中国科学基金, 2020, 34(4): 381–392.
- [31] GUO Feilong, WU Tianci, SHEN Fangdi, et al. The cysteine-rich receptor-like kinase TaCRK3 contributes to defense against *Rhizoctonia cerealis* in wheat [J]. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(20): 6904–6919.
- [32] WU Tianci, ZHU Xiaoliang, LÜ Jiangjie, et al. The wheat receptor-like cytoplasmic kinase TaRLCK1B is required for host immune response to the necrotrophic pathogen *Rhizoctonia cerealis* [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2020, 19(11): 2616–2627.
- [33] HU Ping, LIU Jiaqian, XU Jiefei, et al. A malectin-like/leucine-rich repeat receptor protein kinase gene, *RLK-V*, regulates powdery mildew resistance in wheat [J]. Molecular Plant Pathology, 2018, 19(12): 2561–2574.

(责任编辑: 杨明丽)