论文

中国知名大学及科研院所专栏 中国农业科学院植物保护研究所专辑

MAPK 基因家族成员在棉花抗黄萎病中的功能分析

郭慧敏^{①②}, 翟伟卜^②, 郑娜^{①②}, 张珊珊^②, 郭安慧^{①②}, 张文蔚^②, 简桂良^②,
段江燕^{①*}, 齐放军^{②*}

① 山西师范大学生命科学院, 临汾 041004;

② 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193

* 联系人, E-mail: duanjiangyan123@163.com; fjqi@ippcaas.cn

收稿日期: 2015-12-21; 接受日期: 2016-02-26; 网络版发表日期: 2016-05-25

国家自然科学基金(批准号: 31371898)和国家转基因生物新品种培育重大专项(批准号: 2012ZX08009001)资助

摘要 作为植物中普遍存在的一类保守的丝氨酸/苏氨酸类蛋白激酶信号传导系统, 促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联信号传导途径, 在调控植物生长发育, 传导并响应各类生物和非生物逆境信号胁迫过程中都起着重要作用. 鉴于对棉花(*Gossypium hirsutum* L.) MAPKs 级联信号传导系统中最下游的激酶 MAPK 家族成员缺乏了解, 更不清楚 MAPK 基因家族成员在棉花抗黄萎病中的功能和作用. 本文利用已公布的雷蒙德氏棉(*Gossypium raimondii*)和亚洲棉(*Gossypium arboreum*)基因组数据, 并从美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库中收集陆地棉的 MAPK 氨基酸序列, 成功地对棉花 MAPK 基因家族成员进行了同源分析和聚类. 结果显示, 棉花 MAPK 基因家族各成员均具有特征性 TEY 磷酸化位点或 TDY 磷酸化位点结构特征, 依据其蛋白序列可划分为 A, B, C 和 D 4 个族. 进而从以上各族中分别选择两个 MAPK 基因成员, 利用病毒介导的基因沉默(VIGS)技术, 来研究 MAPK 基因家族成员在棉花抗黄萎病中的作用. 结果发现, 6 个 MAPK 基因家族成员参与了棉花对黄萎病菌的抗性作用, 这提示 MAPKs 级联信号传导途径是参与棉花抗黄萎病信号传导通路之一.

关键词 棉花, MAPK, 聚类分析, VIGS, 黄萎病, 抗病性

棉花是重要的经济作物, 是天然纤维的主要来源^[1]. 土传性维管束真菌病害棉花黄萎病(*Verticillium wilt*), 对棉花生产危害严重, 一旦发生, 棉花产量损失巨大, 品质下降严重^[2].

自然条件下, 植物不仅需要不时地应答干旱、低

温和盐碱等各类非生物逆境胁迫, 还需要应答各类病原菌等引起的生物逆境胁迫, 而蛋白质磷酸化和去磷酸化是植物应答外界信号、调控生物学代谢过程的主要途径. 促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)是一种蛋白激酶, 这

引用格式: 郭慧敏, 翟伟卜, 郑娜, 等. MAPK 基因家族成员在棉花抗黄萎病中的功能分析. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 657–664
Guo H M, Zhai W B, Zheng N, et al. An analysis of the roles of cotton MAPK family members in resistance to *Verticillium wilt* disease. *Sci Sin Vitae*, 2016, 46: 657–664, doi: 10.1360/N052016-00040

种蛋白激酶又称为蛋白磷酸化酶, 包括 MAPK, MAPKK 以及 MAPKKK3 种蛋白激酶, 其通过磷酸化作用来催化底物蛋白质磷酸化(MAPKKK→MAPKK→MAPK), 同时也将上游信号级联放大传递至下游应答分子^[3,4]. 保守的蛋白激酶 MAPK 级联信号传导系统是真核生物应答和传导外界信号的关键通路^[5,6].

培育和种植抗病品种依然是目前防治黄萎病的基本方法, 然而有关棉花抗黄萎基因的克隆及功能研究进展缓慢, 抗黄萎病的主效基因也未见报道^[7]. 有结果显示, 植物的 MAPK 途径参与了各类防卫反应, 如活性氧产生、气孔闭合、植保素合成和超敏反应等的信号传导过程^[8], 然而对 MAPK 级联信号传导途径在棉花抗黄萎病中的作用尚不清楚, 为此, 有必要对这一问题进行专门的研究^[9-12].

本文通过对的陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)、雷蒙德氏棉(*Gossypium raimondii* Ulbrich)和亚洲棉(*Gossypium arboreum* L.) 3 种棉花共 50 个 MAPK 全基因组蛋白序列进行聚类分析, 结果发现, 此基因家族具有特征性结构 TEY 磷酸化位点或 TDY 磷酸化位点, 并依据其蛋白序列可划分为 A, B, C 和 D 4 个族. 在此基础上, 用反向遗传学的病毒诱导的基因沉默(virus induced gene silencing, VIGS)技术, 对 MAPK 基因家族 8 个成员在棉花抗黄萎病中的作用进行了研究, 结果发现, 其中 6 个 MAPK 成员参与了棉花对黄萎病的抗性作用, 分别是 *ADT65136.1 G. hirsutum*, *Gorai.5g109500.1*, *ABA00652.1 G. hirsutum*, *A 22570*, *A 32714* 和 *A 07602* 基因.

1 材料与方法

1.1 棉花 MAPK 基因序列信息的收集

陆地棉 MAPK 基因的 CDS 全序列及其编码的蛋白序列来自数据库 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 以 *Gossypium* MAPK 为检索内容在 NCBI protein/Nucleotide 的选择区进行检索获得所需序列. 雷蒙德氏棉和亚洲棉的 MAPK 基因的 CDS 全序列及其编码的蛋白序列来自棉花信息资源数据库 CottonGen(<https://www.cottongen.org/>), 在其主页面的 News archive 中分别从 CottonCyc Database 和 BGI-CGP *G. arboreum*(A2) genome sequence (assembly v2.0&annotation v1.0)可获得所需两种棉花的序列. 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)MAPK 基因的 CDS

全序列及其编码的蛋白序列来源于拟南芥信息资源数据库 TAIR(<https://www.arabidopsis.org/>), 在主页面 Browse 的 Gene Families 中可寻找到拟南芥 MAP Kinase Gene Family.

1.2 序列分析及系统进化树的构建

利用 MEGA6(molecular evolutionary genetics analysis)软件对该蛋白家族的氨基酸序列进行多序列比对, 参数为默认^[13,14]. 使用 MEGA6 软件中的邻接法(neighbor-joining)进行系统进化树的构建, 其中校验参数自举值(bootstrap)设为 1000 次重复, 用于检测系统进化树各部分置信度^[15-17].

1.3 植物材料、菌株与载体

棉花材料为本实验室培育的陆地棉抗黄萎病品系中植棉 KV3.

VIGS 实验用的棉花皱缩病毒(Cotton leaf crumple virus, CLCrV)沉默载体 pCLCrVA 和 pCLCrVB 由浙江大学周雪平教授馈赠. 所用大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb)弱致病力菌株 V250 及根癌农杆菌菌株 EHA105 为本室保存. pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司(大连).

1.4 材料的培养

采用盆栽式培养法, 选取外观一致的饱满种粒, 先用 75%的乙醇消毒 5 min, 再用 3%的双氧水处理 2 h 后, 无菌水冲洗 3~5 遍, 播种于蛭石和营养土(1:1)中, 每盆播种 5~6 颗种子. 置于 28/22 °C (day/night), 16/8 h(light/dark)条件下培养, 适时浇水, 保持 70%~80%的含水量.

将保存于马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基中的大丽轮枝菌弱致病力落叶型菌株 V250 活化, 进行单孢分离. 挑取单孢培养的菌体在 Czapek's 培养液^[18]中, 25 °C, 200 r/min, 培养 5 天. 待棉苗第二片真叶完全展开时, 采用茎注射法接种大丽轮枝菌 V250, 孢子浓度调至 1.0×10^7 个孢子/mL.

1.5 棉花叶片总 RNA 的提取

参照 Jiang 和 Zhang^[19]以及葛晓萍和石琰璟^[20]的 RNA 提取方法并加以改进. 液氮研磨棉花叶片至粉末, 随液氮转至 50 mL 离心管中, 待液氮挥发后, 迅速加入适量已预热的十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyltrimethyl-ammonium bromide, CTAB)提取

缓冲液 (2% CTAB, 2% 聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone, PVP), 100 mmol/L Tri-HCl (PH8.0), 25 mmol/L 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) (PH8.0), 2 mol/L NaCl, 2%β-巯基乙醇 (用前加)), 剧烈混匀, 65℃ 温浴 8 min, 之后加等体积氯仿, 颠倒混匀; 4℃, 9300×g 离心 15 min, 将上清液转至新的无 RNAase 离心管, 等体积的氯仿抽提数次; 向上清液中加入 1/3 体积的 8 mol/L LiCl, 置于 4℃ 冰箱过夜; 4℃, 13400×g 离心 15 min, 弃上清, 沉淀用 500 μL 75% 乙醇洗涤两次; 超净工作台 (苏净, 上海) 中自然干燥后, 用 30 μL 焦碳酸二乙酯 (diethylpyrocarbonate, DEPC) 处理过的水溶解 RNA. 溶解后的总 RNA 用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测完整性; 同时经微量紫外分光光度计 ND-2000 (Thermo, 美国) 检测所提取 RNA 样品的浓度和纯度, 确定其 A_{260}/A_{280} 的比值均在 1.9~2.1 之间, A_{260}/A_{230} 的比值均在 2.1~2.5 之间, 最终置于 -80℃ 超低温冰箱贮存备用.

1.6 目的片段的克隆

根据从上文各数据库中所获各目的基因的 CDS 全序列, 用软件 Primer Premier 5 设计出 *Gorai.3g139900.1*, *ADT65136.1* *G. hirsutum*, *A 32714*, *ADI52627.1* *G. hirsutum*, *Gorai.5g109500.1*, *ABA00652.1*, *G. hirsutum*, *A 22570* 和 *A 07602* 这 8 个基因的特异性引物 (表 1). 以所提取 RNA 反转录合成的 cDNA 为

模板, 进行 PCR 扩增, 经测序验证后, 克隆到了这 8 个基因对应的目的片段.

1.7 VIGS 载体的构建及农杆菌介导的 VIGS

将上述 PCR 扩增片段胶回收后连接 pMD18-T Simple Vector, 转化大肠杆菌 (*E. coli* DH5α) 并测序验证. 限制性内切酶 *Spe* I 和 *Pac* I 将目的片段从以上 T 载体酶切下来后, 与同样酶切的 pCLCrVA 载体连接并转化, 构建基因沉默载体. 冻融法再将构建好的载体转入农杆菌 EHA105, 在双抗 LB^[21] 平板上 (Kan 100 μg/mL, Rif 50 μg/mL) 筛选阳性克隆, 菌落 PCR 验证构建载体.

棉花的 VIGS 实验采用农杆菌介导的浸染接种法, 待棉花幼苗子叶完全时用农杆菌浸染. 取含有 VIGS 沉默载体的 EHA105 菌株 28℃ 培养至对数生长期, 6000×g 离心 5 min, 收集菌体, 再用乙酰丁香酮溶液 (10 mmol/L 2-吗啉乙磺酸 (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, MES), 200 μmol/L 乙酰丁香酮 (acetosyringone, As), 10 mmol/L MgCl₂) 重悬菌体, 并调整菌液浓度至 $A_{600}=1.0$ 左右. 将它们分别与含 pCLCrVB 的菌株 1:1 混合, 室温静置 3 h 后用于棉花接种. 同时混合含 pCLCrVA 和 pCLCrVB 的 EHA105 菌株, 作为空载体对照. 采用 1 mL 的一次性无菌注射器吸取菌液, 在子叶背部浸染注射接种. 接种后将植株置于 25℃/20℃ (16 h/8 h (光照/黑暗) 条件下培养, 15 天后基因沉默的植株再接种大丽轮枝菌 V250,

表 1 VIGS 构建载体引物信息^{a)}

编号	引物名称	引物序列
1	Gorai.005G109500.1-F	5'-GT <u>ACTAGT</u> ACACCAGTTGAGCCTCT-3'
2	Gorai.005G109500.1-R	5'-TCTTAAATTAATTGGCATCATAACATCTTTC-3'
3	ABA00652.1-F	5'-GT <u>ACTAGT</u> TGGACTGGCACGCACTAG-3'
4	ABA00652.1-R	5'-TCTTAAATTAAGGATGGGCATTTCGGATAA-3'
5	A 22570-F	5'-GT <u>ACTAGT</u> CGGACTATGTTGCTACGC-3'
6	A 22570-R	5'-TCTTAAATTAACATTTGGGAACCTTCTGTGA-3'
7	ADT65136.1-F	5'-GT <u>ACTAGT</u> AAGAATGGAAGGCGGAG-3'
8	ADT65136.1-R	5'-TCTTAAATTAATCAATGCGGAACAAACG-3'
9	Gorai.003G139900.1-F	5'-GT <u>ACTAGT</u> GTGATTCCTCCGCCTT-3'
10	Gorai.003G139900.1-R	5'-TCTTAAATTAAGATACCACCTCGTGACAAC-3'
11	A 32714-F	5'-GT <u>ACTAGT</u> TTTCGTCTATCGGTCGTG-3'
12	A 32714-R	5'-TCTTAAATTAAGGTCGAGCGGATTATGT-3'
13	ADI52627.1-F	5'-GT <u>ACTAGT</u> TTTCGTCTATCGGTCGTG-3'
14	ADI52627.1-R	5'-TCTTAAATTAAGGTCGAGCGGATTATGT-3'
15	A 07602-F	5'-GT <u>ACTAGT</u> GACATCACGCTTCTTTGC-3'
16	A 07602-R	5'-TCTTAAATTAAGTGGCTTCATCTGGGTT-3'

a) 酶切位点, *Spe* I: ACTAGT, *Pac* I: TAAATTA; F: 上游引物, R: 下游引物

检测各基因沉默后棉花植株对黄萎病菌抗性的变化^[22]。

1.8 病级调查和病指计算

接种大丽轮枝菌 V250 25 天后, 参照中华人民共和国国家标准(GB/T 28084-2011)《棉花黄萎病菌检测与鉴定》调查接种棉株的发病情况, 并计算病情指数(disease index, DI)。

病情指数=[Σ(各级病株数×相应病级)/调查总株数×最高病级(4)]×100

病级标准划分如下:

0 级: 植株表现健康, 无任何病症;

1 级: 植株 25%及以下的叶片开始变黄或出现黄褐色斑驳;

2 级: 植株 25%~50%的叶片表现黄褐色斑驳或坏死;

3 级: 植株 50%~75%的叶片表现黄褐色斑驳, 叶片边缘卷曲, 少数叶片枯萎或坏死;

4 级: 植株 75%以上的叶片表现黄色病斑或坏死, 甚至整株都光杆或死亡。

1.9 qRT-PCR 测定基因沉默效率

农杆菌浸染接种 15 天后, 取各基因沉默植株的

叶组织提取总 RNA, 以其反转录后合成的 cDNA 为模板, 通过 qRT-PCR 相对定量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法^[23], 测定各基因的沉默效率。所用试剂为 TaKaRa 的 SYBR Premix Ex TaqTM, 仪器为 ABI7500 Real-time PCR system(Applied Biosystems, 美国)荧光定量仪, 棉花看家基因 *Gbpolyubiquitin-1* 为内标基因^[24]。各基因引物序列见表 2。

2 结果与分析

2.1 棉花 MAPK 基因家族成员间的聚类特征

为了解棉花 MAPK 基因家族成员间的聚类特征, 用 MEGA6 软件对收集的棉花 MAPK 家族成员的蛋白序列进行了同源聚类分析, 用已知的拟南芥 MAPK 家族成员为参照, 构建聚类图(图 1)。

根据 MAPK 蛋白编码氨基酸序列的保守磷酸化结构域的不同, 结果显示, 棉花 MAPK 基因家族分为 TEY 型(磷酸化位点的氨基酸序列为 TEY)和 TDY 型(磷酸化位点的氨基酸序列为 TDY)两类^[25,26]。聚类结果显示, 棉花 MAPK 基因家族可被分为 4 个族, 即 A, B, C 和 D 族。其中 TEY 类包括为 A, B 和 C 族, 剩下的 TDY 类则为 D 族^[25,26]。在所收集到的 3 种棉花的 MAPK 共 50 个基因中, A 族包括 11 个成员, B 族包括 15 个成员, C 族包括 12 个成员, D 族包括 12 个成员。

表 2 qRT-PCR 测定各基因沉默效率所用的引物^{a)}

编号	引物名称	引物序列
1	RT-Gorai.005G109500.1-F	5'-CAGGAAAGAACATGTGAGCAAA-3'
2	RT-Gorai.005G109500.1-R	5'-TATGGAAAAACGCCAGCAAC-3'
3	RT-A 22570-F	5'-CTTGACAGAAATGCGGATAAAA-3'
4	RT-A 22570-R	5'-TTAACATTTGGGAACCTTCTGTGAG-3'
5	RT-ADT65136.1-F	5'-GTGTCGCCCTTATTCCTTT-3'
6	RT-ADT65136.1-R	5'-CGTTTCTGGGTGAGCAAAA-3'
7	RT-ABA00652.1-F	5'-TCCCTGGTACAGAGTGTCTCAA-3'
8	RT-ABA00652.1-R	5'-TTGGGGTTATCTATAAATTCAGGTC-3'
9	RT-Gorai.003G139900.1-F	5'-AGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAG-3'
10	RT-Gorai.003G139900.1-R	5'-TATGGAAAAACGCCAGCAAC-3'
11	RT-A 32714-F	5'-CTTCGGTGGTCAATGATGT-3'
12	RT-A 32714-R	5'-CAAGCTTCTTCGTCACATGG-3'
13	RT-ADI52627.1-F	5'-CTTCGGTGGTCAATGATGT-3'
14	RT-ADI52627.1-R	5'-CAAGCTTCTTCGTCACATGG-3'
15	RT-A 07602-F	5'-ATTCAGTGGCCGTCGTTTAA-3'
16	RT-A 07602-R	5'-GGCGATTAAGTTGGGTAAACG-3'
17	RT-Gbpub1-F	5'-AGCTCGGATACGATTGATAACG-3'
18	RT-Gbpub1-R	5'-GAAGACGAAGAACAAGGGGAAG-3'

a) F: 上游引物; R: 下游引物

图 1 棉花 MAPK 基因家族的聚类图

2.2 VIGS 靶向性沉默棉花 MAPK 基因

在农杆菌浸染接种 15 天时, 用 qRT-PCR 检测了各 MAPK 基因沉默植株中靶基因的转录水平, 并以该基因在空载体(pCLCrVA+B)浸染接种棉花植株中的转录水平为对照, 计算各基因的沉默效率. 结果发现, 所有 MAPK 靶基因在转录水平上均受到沉默, 测得基因 *Gorai.5g109500.1*, *A 22570*, *ADT65136.1 G. hirsutum*, *ABA00652.1 G. hirsutum*, *Gorai.3g139900.1*, *A 32714*, *ADI52627.1 G. hirsutum* 和 *A 07602* 的沉默效

率分别为 84.35%, 88.33%, 83.67%, 84.27%, 29%, 92.23%, 34.13% 和 65.02%(图 2).

2.3 各 MAPK 基因沉默棉花植株对大丽轮枝菌抗性的测定结果

检测了野生型、空载体对照和各 MAPK 基因沉默棉花植株对大丽轮枝菌 V250 的抗性. 根据病级分级标准, 接种 25 天时的调查结果显示, 野生型棉花植株病情指数为 13.60%, 转化空载体棉花植株病情指数为 14.57%, 均表现为抗病; 基因沉默棉花植株 *Gorai.5g109500.1*, *A 22570*, *ADT65136.1 G. hirsutum*, *ABA00652.1 G. hirsutum*, *A 32714* 和 *A 07602* 的病情指数分别为 20.22%, 28.58%, 23.37%, 20.42%, 19.71% 和 20.67%, 与对照组的病情指数相比差异显著, 表现为感病. 这 6 个 MAPK 基因沉默后, 棉花对黄萎病菌表现更为敏感, 说明这些功能一旦缺失, 棉花植株对黄萎病菌的抗性明显下降. 同时基因沉默棉花植株 *Gorai.3g139900.1* 和 *ADI-52627.1 G. hirsutum* 的病情指数分别为 10.66% 和 12.63%, 表现为抗病, 与对照组的病情指数相比差异不显著, 也说明这两个 MAPK 基因参与的信号传导途径可能和棉花对黄萎病菌的抗性无关(图 3 和 4).

图 2 荧光定量 PCR 技术检测基因沉默效率

*: VIGS 实验组与对照组差异显著($P < 0.05$)

图3 棉花 MAPK 基因沉默植株对黄萎病菌弱毒菌株 V250 抗性表现

A: *CHLI* 基因沉默植株(阳性对照); B: 中植棉 KV3(未接种); C: 中植棉 KV3; D: 病毒空载体转化对照植株; E: *Gorai.3g139900.1* 基因沉默植株; F: *ADI52627.1 G. hirsutum* 基因沉默植株; G: *Gorai.005-G109500.1* 基因沉默植株; H: A 22570 基因沉默植株; I: *ADT65136.1 G. hirsutum* 基因沉默植株; J: *ABA00652.1 G. hirsutum* 基因沉默植株; K: A 32714 基因沉默植株; L: A 07602 基因沉默植株。C~L 接种在沉默 15 天后进行, 用大丽轮枝菌弱毒菌株 V250 接种, 接种 25 天后拍照记录

图4 基因沉默植株病情指数

KV3: 中植棉 KV3; pCLCrV(A+B): 空载体转化对照植株; *: 各 MAPK 基因沉默植株的病情指数与对照中植棉 KV3 及空载体 pCLCrV(A+B)转化对照植株相比呈显著差异($P < 0.05$)

3 讨论

植物处于逆境环境时能够通过信号转导调节相关基因的表达, 保守的蛋白激酶 MAPK 就是传导信号的关键分子之一, 研究结果还显示, MAPK 基因参与生物胁迫的调控^[27-30].

棉花是重要经济作物, 黄萎病的发生严重制约着我国棉花产量的提高, 但由于棉花遗传转化难度大^[31-33], 长期以来, 难以对棉花开展大规模的基因功能分析, 对棉花抗黄萎病的分子机制也缺乏了解.

VIGS 是近年来发展出的一种研究植物基因组的强有力工具, 它是利用反向遗传学的策略, 通过病毒介导的小 RNA 靶向性沉默植物目标基因即随之引起的表型变化, 来探究该基因的功能^[34-36]. 2011 年, Gao 等人^[37]报道了一个基于植物病毒改造的适用于棉花功能基因研究的反向遗传学工具—烟草脆裂病毒(Tobacco rattle virus, TRV)VIGS 体系, 运用该体系沉默棉花 *CLAI*(chloroplasts alterados 1 gene)后可获得白化表型. 另外, 利用 VIGS 技术还发现了一些与棉花抗黄萎病相关的基因, 如转录因子 WRKY、苯丙烷代谢相关基因、棉子酚、油菜素内酯相关基因等^[38-40].

本研究首次完成了陆地棉、雷蒙德氏棉和亚洲棉 3 种棉花的所有 MAPK 全基因组蛋白序列的聚类分析, 依据分析结果, 确认棉花 MAPK 基因家族具有特征性结构 TEY 磷酸化位点或 TDY 磷酸化位点, 依据其蛋白序列可划分为 A 族、B 族、C 族和 D 族 4 个族. 从棉花 MAPK 以上各族中分别选择两个基因: *Gorai.3g139900.1* 和 *ADT65136.1 G. hirsutum*(A 族), A 32714 和 *ADI52627.1 G. hirsutum*(B 族), *Gorai.5g109500.1* 和 *ABA00652.1 G. hirsutum*(C 族), A 22570 和 A 07602(D 族), 并运用基于反向遗传学策略的 VIGS 技术, 来研究这些基因在棉花抗黄萎病中的作用. 研究结果表明, 基因 *Gorai.3g139900.1* 和 *ADI52627.1 G. hirsutum* 沉默后, 棉花对黄萎病菌的抗性未受到明显的影响; 而基因 *ADT65136.1 G. hirsutum*, *Gorai.5g109500.1*, *ABA00652.1 G. hirsutum*, A 22570, A 32714 和 A 07602 沉默后, 棉花对黄萎病菌表现更为敏感, 也表明了这 6 个 MAPK 基因调控的信号传导通路可能在棉花抗黄萎病中起重要作用. 这些基础工作有望开拓棉花抗黄萎病信号传导和信号通路的研究.

参考文献

- 1 卢合均, 周忠丽, 陈浩东, 等. 棉花 RAV 基因家族的全基因组分析. 棉花学报, 2014, 26: 471–482
- 2 马存. 棉花枯萎病和黄萎病的研究. 北京: 中国农业出版社, 2007
- 3 朱斌, 梁颖. 植物 MAPK C 族基因的研究进展. 生物技术通报, 2012, 11: 27–31
- 4 赵琳琳, 徐启江, 蒋勇, 等. 生物和非生物胁迫下的植物细胞中丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导. 植物学通报, 2004, 21: 205–215
- 5 Tena G, Asai T, Chiu W L, et al. Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. Curr Opin Plant Biol, 2001, 4: 392–400
- 6 Zhang S, Klessig D F. MAPK cascades in plant defense signaling. Trends Plant Sci, 2001, 6: 520–527
- 7 刘凯, 张华崇, 齐放军, 等. 棉花 GhSKIP35 基因的克隆与表达分析. 棉花学报, 2015, 27: 111–117
- 8 Meng X Z, Zhang S Q. MAPK cascades in plant disease resistance signaling. Annu Rev Phytopathol, 2013, 51: 245–266
- 9 Yin Z J, Wang J J, Wang D L, et al. The MAPKKK gene family in *Gossypium raimondii*: genome-wide identification, classification and expression analysis. Int J Mol Sci, 2013, 14: 18740–18757
- 10 Shi J, Zhang L, An H, et al. GhMPK16, a novel stress-responsive group D MAPK gene from cotton, is involved in disease resistance and drought sensitivity. BMC Mol Biol, 2011, 12: 22
- 11 Shi J, An H L, Zhang L, et al. GhMPK7, a novel multiple stress-responsive cotton group C MAPK gene, has a role in broad spectrum disease resistance and plant development. Plant Mol Biol, 2010, 74: 17
- 12 Idris A M, Tuttle J R, Robertson D, et al. Differential cotton leaf crumple virus-VIGS-mediated gene silencing and viral genome localization in different *Gossypium hirsutum* genetic backgrounds. Physiol Mol Plant Pathol, 2010, 75: 13–22
- 13 Liu Q, Xue Q. Computational identification and phylogenetic analysis of the MAPK gene family in *Oryza sativa*. Plant Physiol Bioch, 2007, 45: 6–14
- 14 Chen L, Hu W, Tan S, et al. Genome-wide identification and analysis of MAPK and MAPKK gene families in *Brachypodium distachyon*. PLoS One, 2012, 7: e46744
- 15 Zhang X Y, Wang L M, Xu X Y, et al. Genome-wide identification of mitogen-activated protein kinase gene family in *Gossypium raimondii* and the function of their corresponding orthologs in tetraploid cultivated cotton. BMC Plant Biol, 2014, 14: 345
- 16 Jiang M, Wen F, Cao J M, et al. Genome-wide exploration of the molecular evolution and regulatory network of mitogen-activated protein kinase cascades upon multiple stresses in *Brachypodium distachyon*. BMC Genomics, 2015, 16: 228
- 17 Wang J, Pan C T, Wang Y, et al. Genome-wide identification of MAPK, MAPKK and MAPKKK gene families and transcriptional profiling analysis during development and stress response in cucumber. BMC Genomics, 2015, 16: 386–407
- 18 王省芬, 马峙英. 一种新的棉花黄萎病抗性鉴定方法. 棉花学报, 2002, 14: 231–233
- 19 Jiang J, Zhang T. Extraction of total RNA in cotton tissues with CTAB-acidic phenolic method. Cotton Sci, 2003, 15: 166–167
- 20 葛晓萍, 石琰璟. 一种适合富含多糖、多酚植物的 RNA 提取方法. 青岛科技大学学报(自然科学版), 2007, 28: 6–8
- 21 方中达. 植病研究方法. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998
- 22 张文蔚. 陆地棉抗黄萎病相关基因筛选及功能验证. 北京: 中国农业科学院植物保护研究所, 2013
- 23 Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Methods, 2001, 25: 402–408
- 24 涂礼莉, 张献龙, 刘迪秋, 等. 棉花纤维发育和体细胞胚发生过程中实时定量 PCR 内对照基因的筛选. 科学通报, 2007, 52: 2379–2385
- 25 MAPK Group (Kazuya Ichimura, et al.). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. Trends Plant Sci, 2002, 7: 301–308
- 26 Kong F, Wang J, Cheng L, et al. Genome-wide analysis of the mitogen-activated protein kinase gene family in *Solanum lycopersicum*. Gene, 2012, 499: 108–120
- 27 Li Y, Zhang L, Wang X, et al. Cotton GhMPK6a negatively regulates osmotic tolerance and bacterial infection in transgenic *Nicotiana benthamiana*, and plays a pivotal role in development. FEBS J, 2013, 280: 5128–5144
- 28 Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling. Trends Plant Sci, 2005, 10: 339–346
- 29 Pitzschke A, Schikora A, Hirt H. MAPK cascade signaling networks in plant defense. Curr Opin Plant Biol, 2009, 12: 421–426
- 30 Romeis T. Protein kinases in the plant defense response. Curr Opin Plant Biol, 2001, 4: 407–414
- 31 邓德旺, 郭三堆, 杨志民. 棉花花粉管通道法转基因的分子细胞学机理研究. 中国农业科学, 1999, 32: 113–114
- 32 Rajasekaran K, Hudspeth R, Cary J, et al. High-frequency stable transformation of cotton(*Gossypium hirsutum* L.) by particle bombardment of embryogenic cell suspension cultures. Plant Cell Rep, 2000, 19: 539–545

- 33 Firoozabady E, Munos S, Cazettes C, et al. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by agrobacterium tumefaciens and regeneration of transgenic plants. *Plant Mol Biol*, 1987, 10: 105–116
- 34 黄昌军, 钱亚娟, 李正和, 等. 病毒诱导的基因沉默及其在植物功能基因组研究中的应用. *中国科学: 生命科学*, 2012, 42: 3–15
- 35 王宏芝, 李瑞芬, 马国英, 等. 病毒诱导的基因沉默及其在植物功能基因组研究中的应用. *自然科学进展*, 2005, 15: 8–14
- 36 李小龙, 谢伶俐, 焦靖芝, 等. VIGS 技术在基因功能研究中的应用进展. *基因组学与应用生物学*, 2014, 33: 1401–1404
- 37 Gao X Q, Wheeler T, Li Z H, et al. Silencing *GhNDR1* and *GhMCK2* compromises cotton resistance to *Verticillium* wilt. *Plant J*, 2011, 66: 293–305
- 38 Gao X Q, Li F J, Li M Y, et al. Cotton *GhBAK1* mediates *Verticillium* wilt resistance and cell death. *J Inter Plant Biol*, 2013, 55: 586–596
- 39 Li C, He X, Luo X Y, et al. Cotton *WRKY1* mediates the plant defense-to-development transition during infection of cotton by *Verticillium dahliae* by activating jasmonate zim-domain 1 expression. *Plant physiol*, 2014, 166: 2179–2194
- 40 Xu L, Zhang W W, He X, et al. Functional characterization of cotton genes responsive to *Verticillium dahliae* infection by RNA sequencing. *BMC Genomics*, 2013, 14: 1–13

An Analysis of the Roles of Cotton MAPK Family Members in Resistance to *Verticillium* Wilt Disease

GUO HuiMin^{1,2}, ZHAI WeiBo², ZHENG Na^{1,2}, ZHANG ShanShan², GUO AnHui^{1,2},
ZHANG WenWei², JIAN GuiLiang², DUAN JiangYan¹ & QI FangJun²

¹ College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China;

² State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

As a conservative serine/threonine protein kinase signal cascade system in plants, mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal pathway plays important roles in regulating plant development and responding to various biotic or abiotic stress signals. However, the downstream kinases of MAPKs signal cascades in cotton, the MAPK family members, and their roles in resistance to cotton verticillium wilt disease are still not clear. Based on the reported cotton genome data of *Gossypium raimondii* and *Gossypium arboreum* and collected sequences of *Gossypium hirsutum* MAPK in NCBI, phylogenetic analysis was performed on these cotton MAPK family members through homologous comparisons. The results showed that all members of cotton MAPK gene family have characteristic TEY phosphorylation site or TDY phosphorylation structure site, and these cotton MAPK members can be divided into 4 groups (A, B, C and D) according to their clustering protein sequence. Furthermore, the roles of cotton MAPK genes in resistance to cotton verticillium wilt disease were studied by virus induced gene silencing (VIGS) technique. Two members in each cotton MAPK groups were chosen for the experiments, and we found that six MAPK members were involved in the resistance to verticillium wilt disease. This result suggested that the cotton MAPK signaling cascade plays essential roles in resistance to verticillium wilt disease.

cotton, mitogen-activated protein kinase (MAPK), homologous cluster analysis, virus induced gene silencing (VIGS), *Verticillium* wilt, disease resistance

doi: 10.1360/N052016-00040