

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.04019

## 甘蓝型油菜 BnMAPK1 的原核表达、亚细胞定位及酵母双杂交文库筛选

王 珍\*\* 姚梦楠\*\* 张晓莉 曲存民 卢 坤 李加纳 梁 颖\*

西南大学农学与生物科技学院 / 油菜工程研究中心 / 西南大学现代农业科学研究院, 重庆 400715

**摘 要:** 植物的丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-Activated Protein Kinases, MAPKs)级联是生长进程中多种信号跨膜传递的共同通路, 它可以将外源刺激转入细胞内并引发细胞应答。目前 C 族 MAPKs 在甘蓝型油菜中的研究报道还很有限。本研究通过 1 个甘蓝型油菜的 C 族 *BnMAPK1* 基因的生物学进程聚类分析发现, *BnMAPK1* 可能参与蛋白磷酸化、生长素介导的信号途径、逆境应答、细胞周期及转录等过程。BnMAPK1 具有 369 个氨基酸残基, 其相对分子量约为 42.5 kD, 其可溶性蛋白可在原核系统中被诱导表达。BnMAPK1 的亚细胞定位结果显示, BnMAPK1 主要在细胞核内表达。Bait 质粒 pGBKT7-BnMAPK1 在酵母双杂交系统中无毒性及自激活活性。为深入研究 BnMAPK1 蛋白参与的生物学进程, 从甘蓝型油菜中油 821 苗期根、茎、叶中分别提取总 RNA, 分离得到 mRNA, 利用 SMART 技术合成并纯化双链 cDNA 后建立甘蓝型油菜混合 cDNA 文库。以共转化法筛选与 BnMAPK1 相互作用的蛋白, 对其分析与鉴定显示, BnMAPK1 在生长发育、非生物及生物逆境、转录、蛋白合成及代谢、翻译及翻译后修饰等过程中起作用。研究结果为 MAPKs 级联, 尤其是 C 族 MAPKs 的研究提供了新的视野, 为甘蓝型油菜抗性的机理研究及分子育种奠定了重要的理论依据。

**关键词:** 甘蓝型油菜; BnMAPK1; 原核表达; 亚细胞定位; 酵母双杂交

## Prokaryotic expression, subcellular localization and yeast two-hybrid library screening of BnMAPK1 in *B. napus*

WANG Zhen\*\*, YAO Meng-Nan\*\*, ZHANG Xiao-Li, QU Cun-Min, LU Kun, LI Jia-Na, and LIANG Ying\*

College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University / Chongqing Engineering Research Center for Rapeseed / Academy of Agricultural Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** Plant mitogen-activated protein kinases (MAPKs) cascades are common signal transduction pathways across the membrane in growth process, they are involved in transducing extracellular stimuli to induce a range of cellular responses. To date, little is known about the role of C-group MAPKs in *B. napus*. In this study, we analyzed biological process ontology of one C-group *BnMAPK1* gene in rapeseed, indicating that *BnMAPK1* may be involved in protein phosphorylation, auxin-mediated signaling, stress response, cell cycles and transcription. With 369 amino acid residues, the hydrophilic protein of BnMAPK1 could be induced to express one 42.5 kD protein in the prokaryotic system. The subcellular localization of BnMAPK1 mainly focused in the nucleus. The pGBKT7-BnMAPK1 bait plasmid without toxicity and auto-activation was constructed to perform yeast-two hybrid screening. To further study the function and mechanism of BnMAPK1, we extracted the total RNA of roots, stems, and leaves of *B. napus* (Zhongyou 821) at seedling stage respectively, and isolated and purified the mRNA to construct the mix cDNA library by SMART method. The BnMAPK1-interacting proteins were screened through co-transformation with bait plasmid and cDNA prey library, demonstrating that BnMAPK1 plays an important role in the growth and development processes, abiotic and biotic stresses, transcription, protein synthesis and metabolism, translation, and post-translational modification, and so on. These results provide a new perspective for the research of MAPKs cascades, especially for C-group MAPKs, and lay a theoretical

本研究由国家自然科学基金项目(31872876, 31271756)和高等学校学科创新引智基地 111 项目(B12006)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31872876, 31271756) and the Project of Intellectual Base for Discipline Innovation in Colleges and Universities (B12006).

\* 通信作者(Corresponding author): 梁颖, E-mail: yliang@swu.edu.cn

\*\* 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 王珍, E-mail: wangzhen.cq@gmail.com; 姚梦楠, E-mail: yaomn3367@163.com

Received (收稿日期): 2020-01-26; Accepted (接受日期): 2020-04-15; Published online (网络出版日期): 2020-05-07.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200507.0800.002.html>

foundation for the stress resistance mechanism research and molecular breeding in rapeseed.

**Keywords:** *Brassica napus*; BnMAPK1; prokaryotic expression; subcellular localization; yeast two-hybrid

油菜是一种重要的油料作物, 占我国的油料供给中较大的比例, 是食用植物油及植物蛋白的重要来源, 在农业生产上占据着举足轻重的地位<sup>[1]</sup>。甘蓝型油菜(*Brassica napus*)作为我国广泛种植的栽培种, 气候、环境、病害、虫害及倒伏等问题已经严重制约其产量及品质, 尤其是低温、干旱、渍害、涝害等非生物胁迫及菌核病、霜霉病等, 直接影响国民增收, 制约油料产业的发展<sup>[2-4]</sup>。

MAPKs 级联是存在于几乎所有真核生物中的保守信号通路<sup>[5]</sup>, 由下而上的组成分别为 MAPKs、MAPKs 激酶 (MAPKKs) 及 MAPKKs 激酶 (MAPKKKs)<sup>[6]</sup>。MAPKs 级联是多种生长信号跨膜传递的交汇点, 植物中的 MAPKs 级联将外源刺激转入胞内并引发一系列的胞内应答, 参与调控基因表达、生长发育、细胞分裂、分化及凋亡等过程, 尤其在翻译后修饰上具有重要意义<sup>[7]</sup>。MAPKs 是一类 Ser/Thr 蛋白激酶, 存在保守氨基酸序列 TXY<sup>[8]</sup>。根据氨基酸的类型, 将其分为 TEY 及 TDY 两种亚型; 根据序列同源性将其分为 A~D 族, A~C 族属于 TEY 亚型, 拟南芥中 C 族 MAPKs 有 4 个成员 (AtMAPK1/2/7/14), D 族属于 TDY 亚型<sup>[9]</sup>。植物中 JA、ABA、生长素、ET 和细胞分裂素的合成与代谢都与 MAPKs 有关<sup>[10]</sup>。拟南芥 AtMAPK1 与 AtMAPK2 在功能上冗余, 响应盐胁迫、损伤、ROS、JA、ABA, 并参与生长素介导的细胞扩增等<sup>[11-16]</sup>。在蓼科藏边大黄 (*Rheum australe*) 中, 低温和 JA 处理条件下 *RaMAPK1* 的转录上调, 而 ABA 处理后下调<sup>[17]</sup>。Blanco 等<sup>[18]</sup>发现马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 块茎中的 *StMAPK1* 在 JA、ABA 及高温处理 24 h 后表达显著增加, 但其表达水平并不响应 SA。Liang 等<sup>[19]</sup>的研究结果显示, 甘蓝型油菜中 BnMAPKK9-BnMAPK1-BnWRKY53 信号通路参与 SA 信号转导途径。这些结果表明, 不同物种中的 *MAPK1* 基因对相同的刺激的响应各不相同, 且不同的信号通路可能介导不同的应答。本课题组前期研究从甘蓝型油菜中克隆到一个 *BnMAPK1* 基因<sup>[20]</sup>, 并发现 MeJA、ABA、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、损伤以及核盘菌均能诱导 *BnMAPK1* 显著上调<sup>[21]</sup>, *BnMAPK1* 超量表达可有效地提高甘蓝型油菜菌核病抗性<sup>[22]</sup>和抗旱性<sup>[23]</sup>。然而, 我们对甘蓝型油菜 BnMAPK1 参与各类生物学进程及相应信号转导过程的分子机理了解依然有限。

由于 MAPKs 通过蛋白质的磷酸化将信号级联放大后传递至下游应答分子, 为了进一步找出 BnMAPK1 的下游靶蛋白, 本试验经过原核表达、亚细胞定位, 通过构建酵母双杂交 cDNA 文库筛选与其互作的蛋白等深入探索, 证明 BnMAPK1 与多种生物/非生物胁迫以及生长发育进程均相关。本研究为逐步深入完善甘蓝型油菜 MAPKs 信号转导网络提供了新的内容, 并为甘蓝型油菜抗性与高产的品种改良奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料甘蓝型油菜黑籽中油 821 DH 系及本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*), 2019 年种植于重庆市油菜工程技术研究中心人工气候光照培养箱, 生长条件为 16 h 光照(25 )/8 h 黑暗(16 ), 湿度 50%。原核表达载体 pET28a (+) 及亚细胞定位表达载体 pEGAD 均由本实验室保存, 酵母双杂交载体 pGBKT7、pGADT7 及酵母菌株 Y2Hgold 由西南大学梅秀鹏博士馈赠。异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、抗生素、LB/YEB 培养基所用试剂购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 酵母质粒提取试剂盒 (TIANprep Yeast Plasmid DNA Kit) 和植物总 RNA 提取试剂盒 (RNAprep pure Plant Kit) 购自北京天根生化科技公司, 酵母双杂交文库构建试剂盒 (SMART cDNA Library Construction Kit) 与酵母培养及转化试剂购自 Clontech 公司, cDNA 均一化试剂盒 (Trimmer-Direct cDNA Normalization Kit) 购自 Evrogen 公司。克隆及连接酶、DNA marker 及核酸纯化试剂盒购自北京全式金生物公司, Ni-NTA agarose beads 购自 GE 公司, 由上海英潍捷基公司合成引物和测序。

### 1.2 BnMAPK1 的生物信息学分析

利用 Unipro UGENE 开源软件进行序列注释及比对; 利用 Primer3web (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) 在线设计基因引物; 利用在线工具 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 BnMAPK1 蛋白的理化性质; 利用在线软件 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 分析二级结构及三级结构; 用在线工具 PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/home>) 分析 BnMAPK1 的氨基

酸组成, 蛋白结合位点、可溶性、无序性及构象柔性, GO 生物学进程聚类分析等; 利用在线工具 NetNES1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>) 预测核输出信号 NES (Nuclear Export Signals); 利用在线工具 ProComp9.0 (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=programs&subgroup=proloc>) 预测蛋白的亚细胞定位。

### 1.3 BnMAPK1 的原核表达

1.3.1 原核表达载体的构建 分别提取甘蓝型油菜中油 821 DH 系植株苗期(3~4 片真叶)根、茎和叶的总 RNA, 各取 0.5  $\mu\text{g}$  均匀混合进行反转录。以 cDNA 为模板, 用特异引物 P-BnMAPK1-F 和 P-BnMAPK1-R 通过 *EasyPfu* 扩增 *BnMAPK1* 基因 CDS, 加 A 连接到 pGEM-T easy 克隆载体, 并转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 对 PCR 鉴定阳性克隆进行测序。对 pGEM-T-BnMAPK1 质粒及 pET28a (+) 载体同时进行 *Bam* H I 和 *Sal* I 双酶切, 分别回收 *BnMAPK1* 片段及 pET28a (+) 骨架, 采用 T4 DNA Ligase 过夜连接(16 h), 转化 DH5 $\alpha$  后 PCR 验证并测序。将阳性 pET28a-BnMAPK1 质粒转化至 BL21 菌株用于原核表达, 所用引物见表 1。

#### 1.3.2 BnMAPK1 原核蛋白大小及诱导时间检测

将测序正确的原核表达菌株 BL21-pET28a-BnMAPK1 及 BL21-pET28a (阴性对照) 与 BL21 (空白对照) 分别按 1 : 1000 活化培养后, 再按 1 : 100 扩大培养, 摇床 37  $^{\circ}\text{C}$ , 250  $\text{r/min}$  震荡培养至 OD<sub>600</sub> 达到 0.6~0.8。加入 IPTG 至终浓度为 1  $\text{mmol/L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  诱导培养, 分别于 0、2、4、6 和 8 h 各取 500  $\mu\text{L}$  菌液。将收集的所有菌液 4  $^{\circ}\text{C}$  6000 $\times g$  离心 10 min, 弃上清液, 2 $\times$ SDS Loading buffer 重悬后 95  $^{\circ}\text{C}$  加热 10 min, 立即冰浴 2 min。4  $^{\circ}\text{C}$  13,000 $\times g$  离心 1 min, 上清液用于表达产物的 SDS-PAGE 电泳检测。

1.3.3 BnMAPK1 原核蛋白可溶性蛋白纯化 取 1  $\text{mmol/L}$  IPTG, 16 h 诱导培养过夜后的 400 mL BL21-pET28a-BnMAPK1 菌液, 4  $^{\circ}\text{C}$  6000 $\times g$  离心 10 min 后, 菌体用 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷 1 $\times$ PBS (137  $\text{mmol/L}$  NaCl, 12.7  $\text{mmol/L}$  KCl, 10  $\text{mmol/L}$  Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2  $\text{mmol/L}$  KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5.8) 洗涤后再次离心, 用于蛋白纯化。加入 20 mL Resuspension buffer A (50  $\text{mmol/L}$  NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300  $\text{mmol/L}$  NaCl, 0.05% Tween-20, pH 8.0), 200  $\text{mg/L}$  Lysozyme, 1  $\text{mmol/L}$  PMSF, 20  $\text{mg/L}$  DNase I 及 1% Triton-X 100, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min。冰浴超声破碎 5 min (破碎 2 s/间歇 5 s, 功率 130 W), 处理后于 4  $^{\circ}\text{C}$  13,000 $\times g$  离心 10 min, 并

用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤杂质, 上清液备用。取 1 mL Ni-NTA agarose beads 加入重力柱, 2 mL Resuspension buffer A 洗涤 beads 两次后, 缓慢加入破碎过滤后的上清液, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min。分别用 20 mL Resuspension buffer B (Resuspension buffer A with 5  $\text{mmol/L}$  imidazole) 和 40 mL Wash buffer (Resuspension buffer A with 20  $\text{mmol/L}$  imidazole) 洗涤 beads, 流出速度约为 1 mL 20  $\text{s}^{-1}$ 。最后用 500  $\mu\text{L}$  Elution buffer (Resuspension buffer A with 100  $\text{mmol/L}$  imidazole) 洗脱 beads, 共洗脱 5 次, 收集流出蛋白液, 用于纯化产物的 SDS-PAGE 电泳检测。

### 1.4 BnMAPK1 的亚细胞定位表达分析

用特异引物 SC-BnMAPK1-F 和 SC-BnMAPK1-R, 以 pET28a-BnMAPK1 测序菌液为模板扩增 *BnMAPK1* CDS 区, 采用 *Eco* R I 和 *Bam* H I 双酶切法, 构建 pEGAD-BnMAPK1 的亚细胞定位表达载体, 将测序质粒转化至农杆菌 LBA4404 菌株, PCR 检测后备用, 所用引物见表 1。LBA4404-pEGAD-BnMAPK1 阳性菌株先以 1 : 1000 比例活化培养, 再以 1 : 100 比例扩大培养, 摇床 28  $^{\circ}\text{C}$ , 250  $\text{r/min}$  震荡培养至 OD<sub>600</sub> 达到 0.8~1.0, 室温 6000 $\times g$  离心 5 min 收集菌体。参照靳义荣等<sup>[24]</sup>方法改进, 加入 Injection buffer (10  $\text{mmol/L}$  MgCl<sub>2</sub>, 10  $\text{mmol/L}$  MES, 200  $\mu\text{mol/L}$  AS) 将菌体重悬至 OD<sub>600</sub> 为 0.4~0.5, 28  $^{\circ}\text{C}$  避光静置 3~6 h 后注射本氏烟草。25  $^{\circ}\text{C}$  黑暗培养瞬时表达烟草植株 48 h, 将叶片下表皮置共聚焦显微镜下观察并照相。

### 1.5 甘蓝型油菜 BnMAPK1 酵母双杂交文库筛选

1.5.1 甘蓝型油菜 cDNA 文库的构建 甘蓝型油菜中油 821 DH 系植株培养至苗期(3~4 片真叶)时, 分别取植株根系、茎(茎尖 2~3 cm) 和叶片(芯芽叶及幼叶)于液氮中速冻研磨均匀, 各取约 100 mg 植株组织粉末, 采用 RNAprep pure Plant Kit 提取各个组织的总 RNA 后等量混合, 利用 SMART cDNA Library Construction Kit 反转录合成 cDNA 后, 使用 Trimmer-Direct cDNA Normalization Kit 进行均一化处理, 回收的 cDNA 通过 CHROMA SPIN-1000 纯化柱去除短片段 cDNA。收集的 cDNA, 参照 SMART cDNA Library Construction Kit 操作手册进行酵母文库的构建。

1.5.2 BnMAPK1 的 Bait 质粒毒性及自激活活性检测 以 pET28a-BnMAPK1 测序菌液为模板, 用特异引物 Y2H-BnMAPK1-F 和 Y2H-BnMAPK1-R 扩增 *BnMAPK1* ORF 区, 采用 *Eco* R I 和 *Bam* H I 双酶切法, 构建 pGBKT7-BnMAPK1 的 Bait 载体, 所用引物见

表 1 所用 PCR 引物

Table 1 PCR primers used in this study

| 引物名称<br>Primer name | 引物序列<br>Primer sequences (5'-3')                                | 用途<br>Usage  |
|---------------------|---|--|
| P-BnMAPK1           | F: GGATCCATGGCGACACCAGTTGATC<br>R: GTCGACTAGCAGCTCAGATGTTGA     | <i>BnMAPK1</i> 的原核表达载体构建<br>Construction of prokaryotic expression vector of <i>BnMAPK1</i>      |
| T7                  | F: TAATACGACTCACTATAGGG<br>R: TGCTAGTTATTGCTCAGCGG              | 原核表达重组载体的检测<br>Detection of prokaryotic expression recombinant vectors                           |
| SC-BnMAPK1          | F: ACGAATTCATGGCGACACCAGTTGATC<br>R: ACGGATCCTAGCAGCTCAGATGTTGA | <i>BnMAPK1</i> 的亚细胞定位表达载体构建<br>Construction of subcellular localization vector of <i>BnMAPK1</i> |
| P389                | F: ACATGGTCTCTGCTGGAGTTC<br>R: ATTGCCAAATGTTTGAACGA             | 亚细胞定位重组载体的检测<br>Detection of subcellular localization recombinant vectors                        |
| eGFP                | F: ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG<br>R: GGAATGTACAGCTCGTCCATGCC          | 亚细胞定位重组载体的检测<br>Detection of subcellular localization recombinant vectors                        |
| Y2H-BnMAPK1         | F: CGGAATTCATGGCGACACCAGTTGATC<br>R: CGGGATCCTCATAGCAGCTCAGATGT | <i>BnMAPK1</i> 的酵母双杂交载体构建<br>Construction of Yeast Two-Hybrid vector of <i>BnMAPK1</i>           |
| BD                  | F: TAATACGACTCACTATAGGG<br>R: TTTTCGTTTTAAACCTAAGAGTC           | Bait 载体的检测<br>Detection of Bait vectors  |
| AD                  | F: TAATACGACTCACTATAGGG<br>R: AGATGGTGCACGATGCACAG              | 文库 Prey 载体的检测<br>Detection of Prey vectors in library  |

表 1。PCR 鉴定后的阳性克隆测序正确后, 参考 Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System 操作手册制作酵母感受态细胞。按照小量转化法将 pGBKT7-BnMAPK1 质粒与 pGADT7 空白质粒共转化至酵母 Y2Hgold 感受态中, 分别涂布 SD/-Leu/-Trp 和 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板, 30 ℃ 倒置培养 3~5 d 后, 观察菌落生长状况。阳性对照为 pGBK-53 与 pGAD-T, 阴性对照为 pGBK-Lam 与 pGAD-T, 空白对照为 Y2Hgold 菌株。

### 1.5.3 文库阳性克隆的筛选、测序及回转验证

参考 Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System 操作手册, 按照大量转化/文库筛选法将 pGBKT7-BnMAPK1 质粒与 10 μg 文库质粒共转化 Y2Hgold 感受态细胞中, 涂布于 SD/-Leu/-Trp 和 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板上。30 ℃ 倒置培养 3~5 d 后, 从所有 SD/-Leu/-Trp 平板中随机挑取 1000 个单克隆转移至 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板上观察生长情况。然后, 将所有 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板上的克隆子划线分离纯化, 按照 TIANprep Yeast Plasmid DNA Kit 说明书, 提取所有 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板分离纯化后的 Y2Hgold-Prey 质粒, 并转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 对 PCR 检测条带 > 300 bp 的 DH5α-Prey 进行测序, 并对其序列比对及 GO 聚类分析。随后, 提取测序的 DH5α-Prey 质粒, 按照小量转化法, 分别将 DH5α-Prey 质粒与 pGBKT7-BnMAPK1 质粒进行点对点回转验证以排除假阳性互作。

## 2 结果与分析

### 2.1 BnMAPK1 的二级结构与三级结构分析

通过 Phyre2、PredictProtein 等工具对 *BnMAPK1* 及其编码的氨基酸序列进行在线预测分析, GO 生物学进程聚类结果显示, *BnMAPK1* 主要参与蛋白质氨基酸磷酸化、生长素介导的信号转导途径、逆境应答、细胞周期及转录等过程, 可信度区间为 10%~46% (表 2)。*BnMAPK1* 编码 369 个氨基酸残基, 相对分子质量为 42.5 kD, 理论等电点(pI)为 6.67。不稳定系数为 42.99, 属于不稳定蛋白。平均亲水性系数为 -0.248, 推测为亲水性蛋白。由图 1-A 可以看出, 在氨基酸组成中, 亮氨酸、异亮氨酸和天冬氨酸出现频率最高, 分别占氨基酸总数的 12.47%、6.78% 和 6.23%。带负电荷的氨基酸残基(Asp+Glu)总数为 43 个, 带正电荷的氨基酸残基(Arg+Lys)为 41 个。利用 Swiss-model 在线软件对 BnMAPK1 蛋白的三级结构进行预测, 得到该蛋白的三维结构(图 1-B)。

二级结构预测结果如图 2 所示, BnMAPK1 含有 15 个蛋白-蛋白/蛋白-核酸结合位点(图 2-A); BnMAPK1 具有 37% α 螺旋(Alpha helix)、16% β 折叠(Beta strand)、14% 无规区域(Disordered)及 4% 跨膜螺旋(TM helix), 且 40% 以上的氨基酸均为隐藏态(Buried) (图 2-B); BnMAPK1 无二硫键, PROFBval 算法预测的无序蛋白(Disordered protein)区域较另外 3 种算法明显更多(图 2-C)。此外, 对 BnMAPK1 的核输出信号(Nuclear Export Signal)预测显示, BnMAPK1 可

表 2 *BnMAPK1* 的 GO 生物学进程聚类分析  
Table 2 GO biological process analysis of *BnMAPK1*

| 序号<br>No. | GO 编号<br>GO ID | GO 名称<br>GO term                             | 可信度<br>Reliability (%) |
|-----------|----------------|--|------------------------|
| 1         | GO:0006468     | 蛋白质氨基酸磷酸化 Protein amino acid phosphorylation | 46                     |
| 2         | GO:0009734     | 生长素介导的信号途径 Auxin mediated signaling pathway  | 20                     |
| 3         | GO:0006950     | 响应逆境 Response to stress                      | 18                     |
| 4         | GO:0007049     | 细胞周期 Cell cycle                              | 10                     |
| 5         | GO:0006350     | 转录 Transcription                             | 10                     |

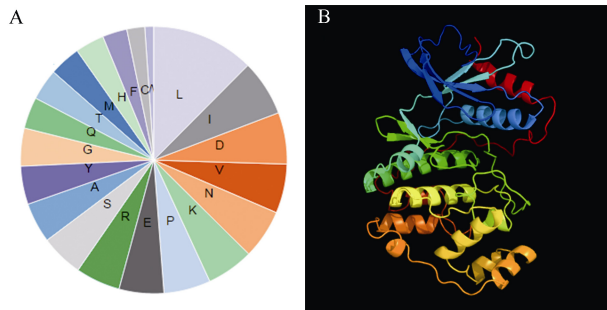


图 1 *BnMAPK1* 的氨基酸组成分析(A)及三维结构预测(N 端到 C 端) (B)  
Fig. 1 Amino acid composition analysis (A) and three dimensional structure (rainbow N to C terminus) of *BnMAPK1* protein (B)

能存在 NES, 且 NES 指导 *BnMAPK1* 的亚细胞定位及核输出。*BnMAPK1* 的亚细胞定位预测结果显示, *BnMAPK1* 可能主要定位在细胞核内。

**2.2 *BnMAPK1* 的原核表达及可溶性蛋白的纯化**  
与阴性对照 BL21-pET28a 与空白对照 BL21 相比, 重组菌株 BL21-pET28a-*BnMAPK1* 在 37 , 1 mmol L<sup>-1</sup> IPTG 浓度条件下, 诱导 2 h 已有明显

表达, 且表达量随诱导时间逐步递增, 重组蛋白大小约为 45 kD, 与预测结果基本一致, 表明 pET28a-*BnMAPK1* 融合蛋白在原核细胞中诱导表达成功 (图 3-A)。通过对温度、IPTG 浓度及诱导时间梯度的检测, 发现 BL21-pET28a-*BnMAPK1* 在 16 , 1 mmol L<sup>-1</sup> IPTG 过夜诱导培养条件下可获得可溶性蛋白。将重组菌株 BL21-pET28a-*BnMAPK1* 在该条件下扩大培养诱导, 成功纯化出 *BnMAPK1* 可溶性蛋白, SDS-PAGE 电泳检测纯化结果如图 3-B, 纯化产物的 Bradford 染色结果如图 3-C。

**2.3 *BnMAPK1* 的亚细胞定位**

通过构建 pEGAD-*BnMAPK1* 表达载体, 并通过本氏烟草瞬时表达 *BnMAPK1*-eGFP 重组蛋白。共聚焦显微镜观察发现, 只表达空白载体 pEGAD 的 eGFP 蛋白时, 烟草表皮细胞中有大量绿色荧光信号, 主要分布在细胞膜、细胞质和细胞核中; 与生物信息预测结果一致的是, *BnMAPK1*-eGFP 融合蛋白在烟草表皮细胞中的荧光信号明显定位在细胞核 (图 4), 表明 *BnMAPK1* 是一种细胞核内的亲水活性蛋白。

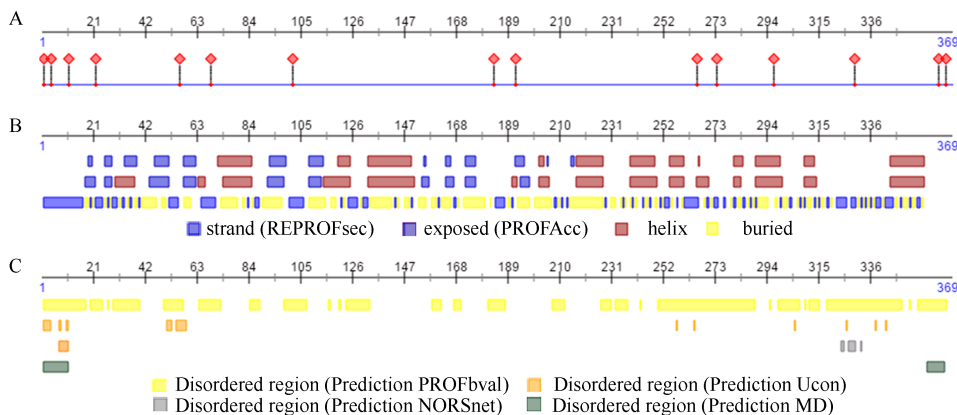


图 2 *BnMAPK1* 的蛋白结合位点(A)、二级结构及可溶性(B)和蛋白无序性及构象柔性预测(C) of *BnMAPK1*  
Fig. 2 Prediction of protein binding sites (A), secondary structure and solvent accessibility (B), and disorder and flexibility (C) of *BnMAPK1*

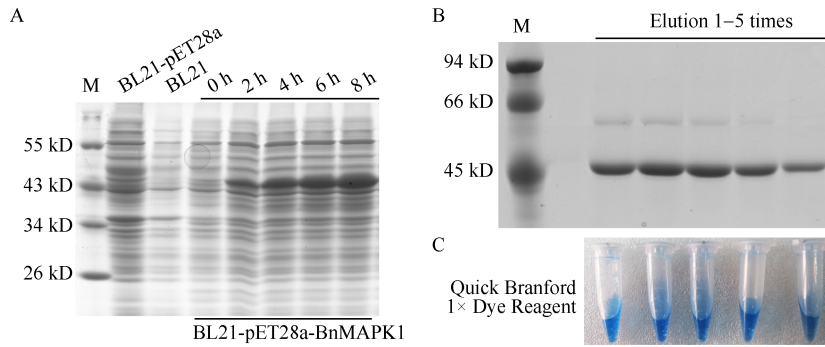


图 3 BnMAPK1 的原核表达(A)、可溶性重组蛋白纯化 SDS-PAGE (B)与 Branford 染色检测(C)  
 Fig. 3 Prokaryotic expression of BnMAPK1 (A), and detection of purified recombinant protein by SDS-PAGE (B), and Branford dye testing (C)

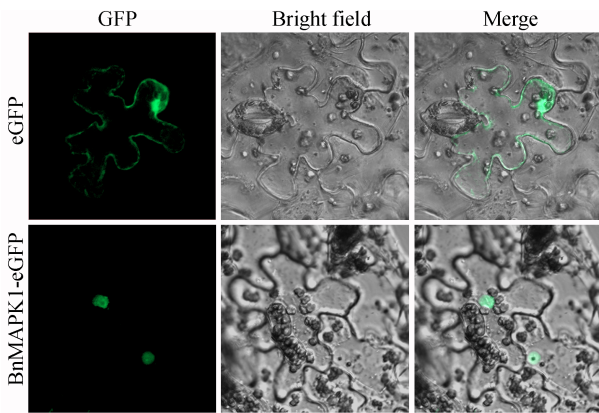


图 4 BnMAPK1-eGFP 融合蛋白的亚细胞定位  
 Fig. 4 Subcellular localization of BnMAPK1-eGFP protein

2.4 甘蓝型油菜 cDNA 文库的建立

提取甘蓝型油菜苗期各组织的总 RNA 等量混合后电泳检测 RNA 质量, 结果 28S 和 18S rRNA 条带清晰(图 5-A), 表明总 RNA 完整性好, 无降解, 符合建库要求。对总 RNA 进一步纯化分离 mRNA, 反转录合成 cDNA, 如图 5-B 所示, 得到的基因较完整, 有明显的特异条带。对其进行均一化处理, 特异高丰度区域削弱明显, 特异条带消失, 效果达到均

一化标准(图 5-C)。将 cDNA 过柱纯化以去除短片段, 结果显示, 保留的片段大小为 500~3000 bp (图 5-D), 有利于文库筛选。cDNA 初级文库质量检测结果显示, 初级文库库容 > 1.5×10<sup>6</sup> cfu, 初级文库的扩增基数 > 11×10<sup>6</sup> cfu, 提取扩增文库质粒于-80 保存备用。

2.5 Bait-BnMAPK1 重组质粒的毒性与自激活检测

采用酵母双杂交核系统检测 Bait-BnMAPK1 的毒性和自激活活性。通过构建 pGBKT7-BnMAPK1 重组载体, 将 pGBKT7-BnMAPK1 和 pGADT7 空白质粒共同转化 Y2Hgold 酵母感受态细胞, 分别涂布 SD/-Leu-Trp 及 SD/-Ade-His-Leu-Trp 平板。酵母菌落生长结果显示, pGBK-53+pGAD-T (positive)、pGBK-Lam+pGAD-T (negative)和 pGBKT7-BnMAPK1+pGADT7 (Bait-BnMAPK1) 3 组均可以在 SD/-Leu-Trp 平板上正常生长, 表明 Bait-BnMAPK1 重组质粒没有毒性。Positive 在 SD/-Ade-His-Leu-Trp 平板上正常生长, 而 Negative 和 Bait-BnMAPK1 均不能生长, 表明 BnMAPK1 没有自激活活性(图 6)。

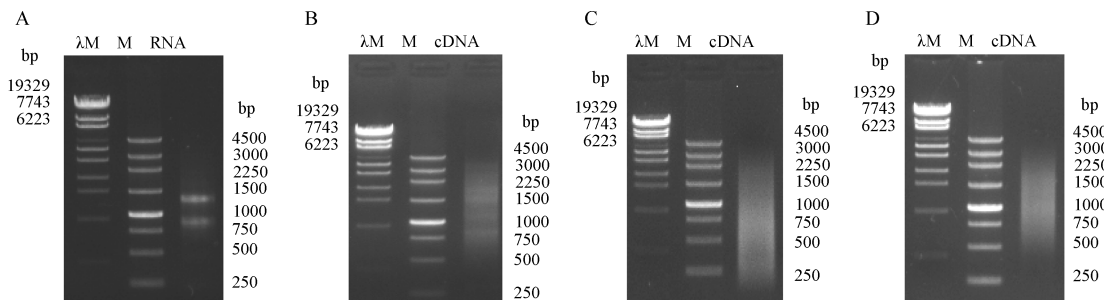


图 5 总 RNA 的提取(A)、均一化前(B)后(C)的 cDNA 及纯化过柱后的 cDNA (D)  
 Fig. 5 Analysis of total RNA extraction (A), cDNA synthesis (B), normalization (C), and purification (D)



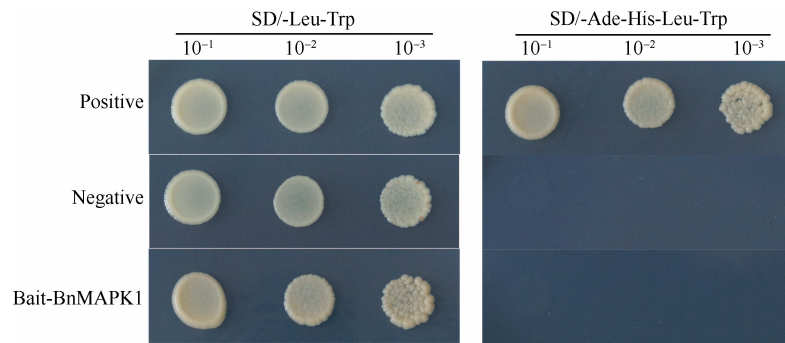


图 6 Bait-BnMAPK1 的毒性和自激活检测  
Fig. 6 Toxicity and autoactivation test of Bait-BnMAPK1

### 2.6 BnMAPK1 的酵母双杂交文库筛选及回转验证

以 pGBKT7-BnMAPK1 为诱饵质粒, 将其与甘蓝型油菜 cDNA 文库质粒共转化 Y2Hgold 酵母细胞筛选 BnMAPK1 的互作蛋白。提取 SD/-Ade-His-Leu-Trp 平板上分离纯化克隆子的质粒, 转化 *E. coli* DH5a 进行 PCR 检测及质粒扩繁, 除去 300 bp 以下的克隆子, 将所有 pGADT7-Prey 与 Bait-BnMAPK1 进行点对点回转验证及测序, 共获得 95 个回转阳性互作蛋白(附图 1), 验证了阳性克隆的准确性, 同时降低了假阳性的概率。对这些阳性克隆进行序列比对, 基因注释信息见附表 1, GO 分析结果显示, BnMAPK1 可能通过与这些蛋白发生相互作用, 参与信号转导、生长发育、光合作用、次生代谢物的生物合成与代谢、磷酸化与去磷酸化等生物学进程,

对冷害、冻害、盐害、高温、干旱、损伤、病原菌等非生物与生物胁迫环境中的植物体进行保护, 并响应植物激素如 ET、JA、SA、ABA 等(图 7), 表明 BnMAPK1 在植物的整个生长周期内具有重要的生物学意义。

### 3 讨论

在过去的几十年中, 植物 MAPKs 级联途径在生长周期里如何接收并传递信号已经得到广泛的研究, 其中 MAPKs 的蛋白磷酸化具有重要生物学意义<sup>[8,25-26]</sup>。关于植物 MAPKs 级联的研究, 主要集中在拟南芥、烟草、苜蓿(*Medicago sativa*)、番茄、欧芹(*Petroselinum crispum*)、水稻等植物的 A 族与 B 族 MAPKs (MAPK3/6, MAPK4), 由于它们在植物中

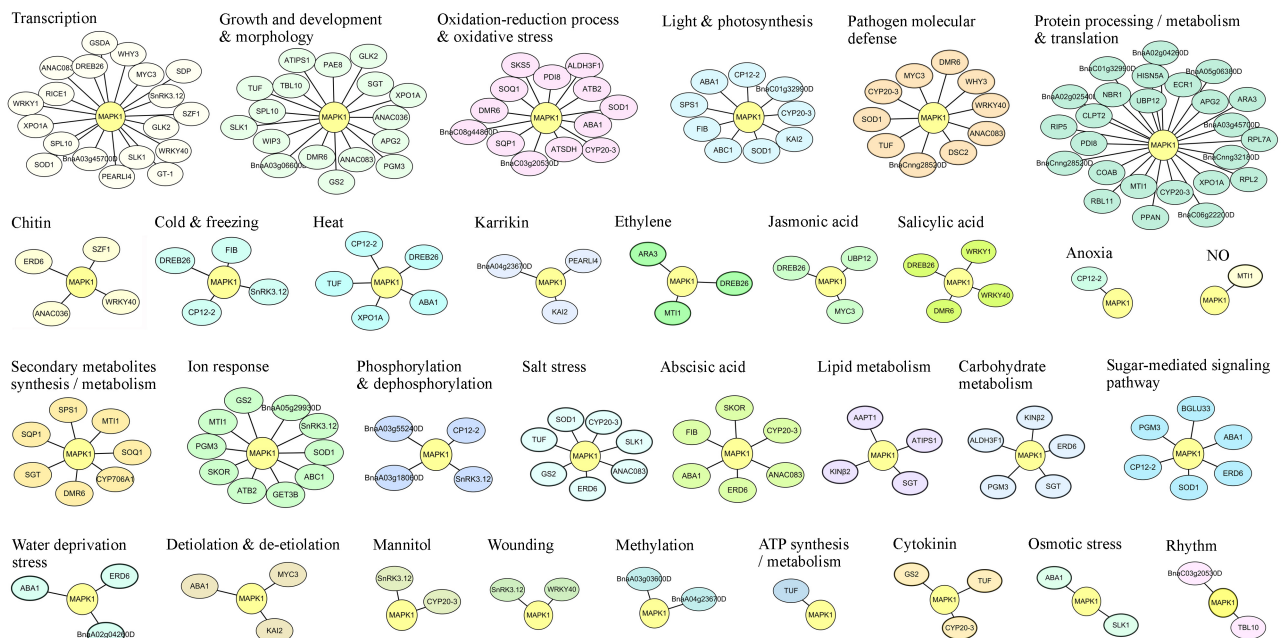


图 7 BnMAPK1 候选阳性互作蛋白的调控网络  
Fig. 7 Regulatory network of positive BnMAPK1-interacting candidate proteins

的激酶活性较容易检测到, 其研究内容更为透彻<sup>[27]</sup>, 相较而言, C 族(MAPK1/2/7/14)的研究还很局限。本研究中, 我们将甘蓝型油菜 C 族 BnMAPK1 定位于细胞核, 并在原核系统中成功地表达纯化了 BnMAPK1 的可溶性活性蛋白, 利用酵母双杂交系统筛选到 95 个 BnMAPK1 相互作用蛋白, 对 BnMAPK1 可能存在的网络机制进行了解析, 不仅对 BnMAPK1 在植物抗逆及生长发育分子机制方面有所了解, 还为探索 BnMAPK1 蛋白的未知生物学功能提供了新线索。

植物在不同环境胁迫下, 特异 MAPKs 通路被激活, 通过调控下游的转录水平或磷酸化相关蛋白, 响应不同的刺激并传递信号以行使生物学功能。MAPKs 在被其上游不同的 MAPKKs 激活时, 参与不同的生物学进程, 表现出不同的激活特性<sup>[28]</sup>。在哺乳动物和酵母中, MAPKs 的激活与其在细胞内定位的动态变化相关, 该信号转导通路中各组分的定位受到严格控制<sup>[29]</sup>。已有研究表明, NES 在蛋白激酶的亚细胞定位及核输出具有重要指导意义<sup>[30]</sup>。Yoo 等<sup>[31]</sup>发现 O<sub>3</sub> 处理拟南芥后, AtMAPK3 与 AtMAPK6 受到激活, 迅速转移至细胞核内。Ahlfors 等<sup>[32]</sup>发现花生中 AhMAPK3 与 AhMAPK6 在细胞质和细胞核中均有表达, 但 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后则仅在细胞核内表达。本研究对 BnMAPK1 蛋白的结构预测发现其可能含有 NES, 且亚细胞定位试验结果显示主要定位在细胞核中。我们推测, BnMAPK1 的核移位可能是信号转导过程中非常关键的一步, BnMAPK1 蛋白在核内的积累对于胁迫响应是必要的。

在逆境中, 植物进化出一些特殊机制, 通过调控酶活性、转录、翻译及翻译后修饰等, 感知并适应环境。MAPKs 级联作为进化保守的信号通路, 将信号转入胞内, 通过活化细胞骨架蛋白、转录因子、磷脂酶、微管相关蛋白, 调控特定的基因簇或翻译后修饰, 参与多种生理、生长、发育及激素等生物学过程<sup>[33-36]</sup>。其中, 植物 MAPK1 响应激素(如 ABA、IAA 等)与逆境胁迫(如干旱、渗透压、盐害、损伤等)<sup>[37]</sup>等过程。研究表明, 拟南芥中, LHCB3 (light-harvesting chlorophyll B-binding protein 3)<sup>[38]</sup>、CURT1B (curvature thylakoid 1B)<sup>[39]</sup>、SKOR (shaker-like K<sup>+</sup> outward rectifying channel)<sup>[40]</sup>与 ERD6 (early response to dehydration 6)<sup>[41]</sup>等均能够响应 ABA 且参与调控 ABA 信号转导途径; *ABA1* (*ABA deficient 1*) 基因编码一个玉米黄质环氧酶, 直接控制 ABA 的生

物合成与积累, 进而调控植物对高盐及干旱的耐受性<sup>[42-43]</sup>。另外, UBP12 (ubiquitin-specific protease 12) 和 MYC3 被报道参与 JA 介导的信号途径, 前者主要与蛋白泛素化相关<sup>[44]</sup>, 而后者正向调控依赖于 JA 途径相关基因的转录表达<sup>[45]</sup>。IAA17 (indole-3-acetic acid inducible 17) 被报道调控植物生长素的积累及信号转导, 是叶片衰老的正向调控因子, 可通过与 GA 信号转导途径交联调控 NO 介导的盐胁迫途径<sup>[46-47]</sup>。因此, 本研究推测, BnMAPK1 可能通过与上述激素相关蛋白互作, 使得 MAPKs 级联与多种激素相关的信号转导途径交联, 参与甘蓝型油菜的生长发育及抗逆等过程。

综上, 本研究从甘蓝型油菜 cDNA 文库中获得多个与 BnMAPK1 相互作用的靶蛋白。通过分析这些靶蛋白的生物学功能发现, 它们参与植物生长发育及逆境胁迫的响应等过程。初步提出了 BnMAPK1 参与调控生长周期及提高植物抗逆性的可能分子机制, 对 BnMAPK1 功能及作用机制的深入研究必将大大推动植物 MAPKs 级联途径在提高甘蓝型油菜抗逆机制中的研究与应用, 为改良甘蓝型油菜品质, 培养抗逆新品种提供重要理论依据。

## 4 结论

甘蓝型油菜 *BnMAPK1* 编码 369 个氨基酸, 编码蛋白大小约为 45 kD。BnMAPK1 主要定位在细胞核内。该蛋白在酵母中不具有毒性及自激活活性。利用酵母双杂交筛选甘蓝型油菜中的 BnMAPK1 互作蛋白, 获得 95 个初步验证的阳性克隆。BnMAPK1 可能通过与这些蛋白结合或磷酸化, 调控或传递相关信号, 维持植物的正常生长发育并响应逆境等过程。

附图和附表 请见网络版: 1) 本刊网站 <http://zwxb.chinacrops.org/>; 2) 中国知网 <http://www.cnki.net/>; 3) 万方数据 <http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-zwxb.aspx>。

## References

- [1] Cai G, Yang Q, Chen H, Yang Q, Zhang C, Fan C, Zhou Y. Genetic dissection of plant architecture and yield-related traits in *Brassica napus*. *Sci Rep*, 2016, 6: 21625. doi: 10.1038/srep21625.
- [2] 王汉中. 我国油菜产业发展的历史回顾与展望. 中国油料作物学报, 2010, 32: 300-302.  
Wang H Z. Review and future development of rapeseed industry in China. *Chin J Oil Crop Sci*, 2010, 32: 300-302 (in Chinese)



- with English abstract).
- [3] 刘成, 冯中朝, 肖唐华, 马晓敏, 周广生, 黄凤洪, 李加纳, 王汉中. 我国油菜产业发展现状、潜力及对策. 中国油料作物学报, 2019, 41: 485–489.  
Liu C, Feng Z C, Xiao T H, Ma X M, Zhou G S, Huang F H, Li J N, Wang H Z. Development, potential and adaptation of Chinese rapeseed industry. *Chin J Oil Crop Sci*, 2019, 41: 485–489 (in Chinese with English abstract).
- [4] 季争. 中国油菜生产技术供需的经济学分析. 华中农业大学博士学位论文, 湖北武汉, 2011.  
Li Z. Economic Analysis of Supply and Demand in Rape Production Technology in China. PhD Dissertation of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2011 (in Chinese with English abstract).
- [5] Kelkar N, Gupta S, Dickens M, Davis R J. Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 1030–1043.
- [6] Hamel L P, Nicole M C, Duplessis S, Ellis B E. Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: distinct messages from conserved messengers. *Plant Cell*, 2012, 24: 1327–1351.
- [7] Fiil B K, Petersen K, Petersen M, Mundy J. Gene regulation by MAP kinase cascades. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12: 615–621.
- [8] Colcombet J, Hirt H. *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J*, 2008, 413: 217–226.
- [9] Ortiz-Masia D, Perez-Amador M A, Carbonell J, Marcote M J. Diverse stress signals activate the C1 subgroup MAP kinases of *Arabidopsis*. *FEBS Lett*, 2007, 581: 1834–1840.
- [10] Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, Bors E H, Ellis B E, Morris P C, Innes R W, Ecker J R, Scheel D, Klessig D F, Machida Y, Mundy J, Ohashi Y, Walker J C. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci*, 2002, 7: 301–308.
- [11] Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Matsumoto K, Shinozaki K. A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 765–769.
- [12] Umezawa T, Sugiyama N, Takahashi F, Anderson J C, Ishihama Y, Peck S C, Shinozaki K. Genetics and phosphoproteomics reveal a protein phosphorylation network in the abscisic acid signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Signal*, 2013, 6: rs8.
- [13] Danquah A, Zelicourt A, Boudsocq M, Neubauer J, Frey N F, Leonhardt N, Pateyron S, Gwinner F, Tamby J P, Ortiz-Masia D, Marcote M J, Hirt H, Colcombet J. Identification and characterization of an ABA-activated MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2015, 82: 232–244.
- [14] Danquah A, Zelicourt A, Colcombet J, Hirt H. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnol Adv*, 2014, 32: 40–52.
- [15] Chardin C, Krapp A, Schenk S T, Hirt H, Colcombet J. Review: mitogen-activated protein kinases in nutritional signaling in *Arabidopsis*. *Plant Sci*, 2017, 260: 101–108.
- [16] Enders T A, Frick E M, Strader L C. An *Arabidopsis* kinase cascade influences auxin-responsive cell expansion. *Plant J*, 2017, 92: 68–81.
- [17] Ghawana S, Kumar S, Ahuja P S. Early low-temperature responsive mitogen activated protein kinases RaMPK1 and RaMPK2 from *Rheum australe* D. Don respond differentially to diverse stresses. *Mol Biol Rep*, 2010, 37: 933–938.
- [18] Blanco F A, Zanetti M E, Casalongue CA, Daleo G R. Molecular characterization of a potato MAP kinase transcriptionally regulated by multiple environmental stresses. *Plant Physiol Biochem*, 2006, 44: 315–322.
- [19] Liang W, Yang B, Yu B J, Zhou Z, Li C, Jia M, Sun Y, Zhang Y, Wu F, Zhang H, Wang B, Deyholos M, Jiang Y Q. Identification and analysis of MKK and MPK gene families in canola (*Brassica napus* L.). *BMC Genomics*, 2013, 14: 392.
- [20] 陆俊杏, 卢坤, 朱斌, 彭茜, 陆奇丰, 曲存民, 殷家明, 李加纳, 梁颖, 柴友荣. 芸薹属物种 (*B. napus*, *B. oleracea*, *B. rapa*) MAPK1 家族的克隆、进化和表达特征. 中国农业科学, 2013, 46: 3478–3487.  
Lu J X, Lu K, Zhu B, Peng Q, Lu Q F, Qu C M, Yin J M, Li J N, Liang Y, Chai Y R. Cloning, evolution and expression features of MAPK1 gene family from *Brassica* species (*B. napus*, *B. oleracea*, *B. rapa*). *Sci Agric Sin*, 2013, 46: 3478–3487 (in Chinese with English abstract).
- [21] 陆俊杏, 陆奇丰, 张凯, 柴友荣, 李加纳, 钱伟, 吕俊, 卢坤, 梁颖. 甘蓝型油菜 MAPK1 在损伤和病原菌胁迫下的表达模式分析. 中国农业科学, 2013, 46: 4388–4396.  
Lu J X, Lu Q F, Zhang K, Chai Y R, Li J N, Qian W, Lyu J, Lu K, Liang Y. Expression features of *BnMAPK1* in wound and pathogenic fungi stress. *Sci Agric Sin*, 2013, 46: 4388–4396 (in Chinese with English abstract).
- [22] 王淑文, 陆俊杏, 万华方, 翁昌梅, 王珍, 李加纳, 卢坤, 梁颖. *BnMAPK1* 超量表达提高甘蓝型油菜菌核病抗性. 作物学报, 2014, 40: 745–750.  
Wang S W, Lu J X, Wan H F, Weng C M, Wang Z, Li J N, Lu K, Liang Y. Overexpression of *BnMAPK1* enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus*. *Acta Agron Sin*, 2014, 40: 745–750 (in Chinese with English abstract).
- [23] Weng C M, Lu J X, Wan H F, Wang S W, Wang Z, Lu K, Liang Y. Over-expression of *BnMAPK1* in *Brassica napus* enhances tolerance to drought stress. *J Integr Agric*, 2013, 13: 2407–2415.
- [24] 靳义荣, 宋毓峰, 白岩, 张良, 董连红, 刘朝科, 冯祥国, 胡晓明, 王倩, 刘好宝. 林烟草钾离子通道基因 *NKT6* 的克隆与表达定位分析. 作物学报, 2013, 39: 1602–1611.  
Jin Y R, Song Y F, Bai Y, Zhang L, Dong L H, Liu C K, Feng X G, Hu X M, Wang Q, Liu H B. Molecular cloning and expression analysis of potassium channel gene *NKT6* in *Nicotiana sylvestris*. *Acta Agron Sin*, 2013, 39: 1602–1611 (in Chinese with English abstract).
- [25] Dóczy R, Brader G, Pettkó-Szandtner A, Rajh I, Djamei A, Pitzschke A, Teige M, Hirt H. The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *Plant Cell*, 2007, 19: 3266–3279.
- [26] Pitzschke A. Modes of MAPK substrate recognition and control.

- Trends Plant Sci*, 2015, 20: 49–55.
- [27] Zhang M, Su J, Zhang Y, Xu J, Zhang S. Conveying endogenous and exogenous signals: MAPK cascades in plant growth and defense. *Curr Opin Plant Biol*, 2018, 45: 1–10.
- [28] 潘教文, 李德全. 植物 MAPK 信号转导组分的细胞定位与选择性剪接. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010, 26: 393–400. Pan J W, Li D Q. Cellular localization of components of mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades and alternative splicing. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2010, 26: 393–400 (in Chinese with English abstract).
- [29] Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J*, 1999, 18: 664–674.
- [30] Furuno T, Hirashima N, Onizawa S, Sagiya N, Nakanishi M. Nuclear shuttling of mitogen-activated protein (MAP) kinase (extracellular signal-regulated kinase (ERK) 2) was dynamically controlled by MAP/ERK kinase after antigen stimulation in RBL-2H3 cells. *J Immunol*, 2001, 166: 4416–4421.
- [31] Yoo S D, Cho Y H, Tena G, Xiong Y, Sheen J. Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> signaling. *Nature*, 2008, 451: 789–795.
- [32] Ahlfors R, Maccioszek V, Rudd J, Brosche M, Schlichting R, Scheel D, Kangasjarvi J. Stress hormone independent activation and nuclear translocation of mitogen activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *Plant J*, 2004, 40: 512–522.
- [33] Neill S, Desikan R, Hancock J. Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5: 388–395.
- [34] Popescu S, Popescu G, Bachan S, Zhang Z, Gerstein M, Snyder M, Dinesh-Kumar S P. MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev*, 2009, 23: 80–92.
- [35] Andreasson E, Ellis B. Convergence and specificity in the *Arabidopsis* MAPK nexus. *Trends Plant Sci*, 2010, 15: 106–113.
- [36] Taj G, Agarwal P, Grant M, Kumar A. MAPK machinery in plants. *Plant Signal Behav*, 2010, 5: 1370–1378.
- [37] Zhang S, Klessig D F. MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci*, 2001, 6: 520–527.
- [38] Xu Y H, Liu R, Yan L, Liu Z Q, Jiang S C, Shen Y Y, Wang X F, Zhang D P. Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 2012, 63: 1095–1106.
- [39] Kline K G, Barrett-Wilt G A, Sussman M R. In planta changes in protein phosphorylation induced by the plant hormone abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 15986–15991.
- [40] Liu J, Jia C, Dong F, Wang J, Zhang J, Xu Y, Xu B, Jin Z. Isolation of an abscisic acid senescence and ripening inducible gene from litchi and functional characterization under water stress. *Planta*, 2013, 237: 1025–1036.
- [41] Kiyosue T, Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. *ERD6*, a cDNA clone for an early dehydration-induced gene of *Arabidopsis*, encodes a putative sugar transporter. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1370: 187–191.
- [42] Xiong L, Lee H, Ishitani M, Zhu J K. Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the *LOS6/ABAI* locus in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2002, 277: 8588–8596.
- [43] Xiong L, Schumaker K S, Zhu J K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, 2002, 14: S165.
- [44] Jeong J S, Jung C, Seo J S, Kim J K, Chua N H. The deubiquitinating enzymes UBP12 and UBP13 positively regulate MYC2 levels in jasmonate responses. *Plant Cell*, 2017, 29: 1406–1424.
- [45] Goossens J, Swinnen G, Vanden B R, Pauwels L, Goossens A. Change of a conserved amino acid in the MYC2 and MYC3 transcription factors leads to release of JAZ repression and increased activity. *New Phytol*, 2015, 206: 1229–1237.
- [46] Liu W, Li R J, Han T T, Cai W, Fu Z W, Lu Y T. Salt stress reduces root meristem size by nitric oxide-mediated modulation of auxin accumulation and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2015: 168: 343–356.
- [47] Shi H, Liu W, Wei Y, Ye T T. Integration of auxin/indole-3-acetic acid 17 and RGA-LIKE3 confers salt stress resistance through stabilization by nitric oxide in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 2017, 68: 1239–1249.