

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2022.10066

高鹏华, 张颢, 王其刚, 晏慧君, 蹇洪英, 鄢波, 唐开学, 邱显钦. *RcMPK3* 正向调控月季对灰霉病菌的响应[J]. 植物科学学报, 2022, 40(1): 66-73Gao PH, Zhang H, Wang QG, Yan HJ, Jian HY, Yan B, Tang KX, Qiu XQ. *RcMPK3* positively regulates *Rosa chinensis* 'Old Blush' in response to *Botrytis cinerea*[J]. *Plant Science Journal*, 2022, 40(1): 66-73

RcMPK3 正向调控月季对灰霉病菌的响应

高鹏华^{1, 2, 3}, 张颢^{2, 3}, 王其刚^{2, 3}, 晏慧君^{2, 3}, 蹇洪英^{2, 3},
鄢波¹, 唐开学^{3*}, 邱显钦^{1, 2*}

(1. 西南林业大学园林园艺学院, 国家林业局西南风景园林工程技术研究中心, 云南省功能性花卉资源及产业化技术工程研究中心, 昆明 650024; 2. 云南省农业科学院花卉研究所, 昆明 650205; 3. 国家观赏园艺工程技术研究中心, 昆明 650205)

摘要: 灰霉病是月季采后和运输过程中危害最严重的真菌病害。MPK3 基因参与植物对逆境的响应。基于古老月季品种‘月面粉’(*Rosa chinensis* ‘Old Blush’ Jacq.) 全基因组数据, 利用 RT-PCR 技术获得了包含完整 ORF 区的 *RcMPK3* 基因, 并对其进行生物信息学分析和功能检测。结果显示: *RcMPK3* 基因 ORF 序列长 1113 bp, 编码 370 个氨基酸, 系统进化树分析结果表明 *RcMPK3* 蛋白与 *FvMPK3* 蛋白聚为一支; 对基因全长序列分析发现, *RcMPK3* 由 6 个外显子和 5 个内含子构成, 启动子序列包含 10 类响应激素和逆境相关的顺式元件; qPCR 分析表明, *RcMPK3* 受 SA 和 JA 诱导表达, 同时, 在灰霉病菌(*Botrytis cinerea*) 侵染过程中, *RcMPK3* 基因表达量也显著提高; VIGS 分析发现, 基因沉默株系病斑直径显著大于对照组株系, 表明 *RcMPK3* 基因可能正向调控月季对灰霉病菌的抗性。

关键词: 月季; 灰霉病; MPK3 基因; 启动子; 植物激素; qPCR; VIGS

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2022)01-0066-08

RcMPK3 positively regulates *Rosa chinensis* ‘Old Blush’ in response to *Botrytis cinerea*

Gao Peng-Hua^{1, 2, 3}, Zhang Hao^{2, 3}, Wang Qi-Gang^{2, 3}, Yan Hui-Jun^{2, 3}, Jian Hong-Ying^{2, 3},
Yan Bo¹, Tang Kai-Xue^{3*}, Qiu Xian-Qin^{1, 2*}

(1. College of Landscape Architecture and Horticulture, Southwest Forestry University/State Forestry Administration Southwest Landscape Gardening Engineering Technology Research Center/Functional Flower Resources and Industrialization Technology Engineering Research Center of Yunnan Province, Kunming 650024, China; 2. Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China; 3. National Engineering Research Center for Ornamental Horticulture, Kunming 650205, China)

Abstract: Gray mold is the most serious fungal disease in rose after harvest and during transportation. The *MPK3* gene participates in the plant response to stress. Here, RT-PCR technology was used to isolate and clone the full length of the *RcMPK3* gene based on whole-genome data of *Rosa chinensis* ‘Old Blush’ Jacq. Results showed that the open reading

收稿日期: 2021-07-01, 修回日期: 2021-08-03。

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD1000400); 国家自然科学基金(31560565); 云南省科技厅科技人才引进与培养专项“科技领军人才”(2016HA005); 云南省“万人计划”青年拔尖人才和云岭产业技术领军人才培养项目; 云南省高校科技创新团队支持计划。

This work was supported by grants from the National Key R & D Program of China (2018YFD1000400); National Natural Science Foundation of China (31560565); Major Science and Technology Projects of Yunnan Province (2016HA005); Youth Top-Notch Talents Training Project of ‘Ten Thousand Talents Plan’ of Yunnan Province and Leading Talents of Yunling Industrial Technology and Yunnan University Science and Technology Innovation Team Support Plan.

作者简介: 高鹏华(1993-), 女, 博士, 研究方向为月季抗病遗传(E-mail: gaopenghua8878@dingtalk.com)。

* 通讯作者(Authors for correspondence. E-mail: kxtang@hotmail.com; xianqin711@hotmail.com)。

frame (ORF) sequence of *RcMPK3* was 1113 bp long and encoded 370 amino acids. Phylogenetic analysis showed that the *RcMPK3* protein was clustered with *FvMPK3*. The full-length sequence of the *RcMPK3* gene was analyzed, which showed that *RcMPK3* was composed of six exons and five introns. There were 10 cis-elements in *RcMPK3*. Quantitative real time PCR (qPCR) analysis showed that *RcMPK3* was induced by salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA). *RcMPK3* expression significantly increased under *Botrytis cinerea* stress. Functional analysis of *RcMPK3* by VIGS showed that lesion diameter in the gene-silenced plant was significantly larger than that in the control, indicating that the *RcMPK3* gene positively regulates the resistance of rose to *B. cinerea*.

Key words: *Rosa chinensis*; Gray mold; *MPK3* gene; Promoter; Plant hormone; qPCR; VIGS

植物遭受病原菌侵染时, MAPK (Mitogen-activated protein kinases) 是最早被激活的级联途径之一。MAPK 家族成员具有相似的结构, 都含有 11 个保守的蛋白激酶亚区, 第 VII 和第 VIII 亚区之间存在高度保守的 TXY (Thr-X-Tyr) 基序^[1]。根据 A-loop 中的保守磷酸化基序, MAPKs 可分为 TEY 和 TDY 亚型^[2]。近年来的研究表明, MAPK 级联反应通过激活不同的下游基因表达参与植物对不同病原菌的防御反应。在小麦 (*Triticum aestivum* L.) 中, TaMKK5-TaMPK3 级联通过磷酸化 *TaERF3* 基因, 激活下游 *TaGST1*、防御素和几丁质酶 2 基因的表达, 提高其对纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*) 的抗性^[3]。在苹果 (*Malus domestica* Borkh., nom. con. prop.) 中, MdMKK4-MdMPK3 模块通过磷酸化 *MdWRKY17* 直接调节 SA 降解基因 *TaERF3* 的表达, 提高其对叶斑病菌 (*Alternaria mali*) 的抗性^[4]。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 中, *MPK3* 基因通过介导 *WRKY33* 的磷酸化调节体内植保素的合成, 从而提高对真菌病害的抗性^[5]; *MPK3* 和 *MPK6* 基因能够通过激活 *GLIP1* 和 *GLIP3* 基因的表达参与对灰霉菌的抗性^[6]; *MPK3* 基因能够促进吲哚硫苷 (IGS) 途径相关代谢物的合成和转化参与植物防御^[7]; 而 CPK5/CPK6 和 *MPK3*/*MPK6* 介导的信号通路协同调节吲哚硫甙和植保素的生物合成参与对灰霉菌的抗性^[8]。以上研究表明 *MPK3* 基因在 MAPK 级联反应途径参与植物对病原菌的抗性过程中具有重要作用。月季 (*Rosa chinensis* Jacq.) 是世界第一切花, 具有重要的观赏价

值和经济价值。月季灰霉病由灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) 引起, 是切花月季采后运输过程中的第一大真菌病害, 每年导致约 15 ~ 40% 的切花月季发生采后腐败, 造成了巨大的经济损失。因此, 探究月季对灰霉菌的抗性具有重要意义。本研究通过对月季品种‘月月粉’ (‘Old Blush’) *RcMPK3* 基因进行分离克隆和生物信息学分析, 了解该基因对灰霉菌的响应模式, 利用 VIGS 技术初步解析其功能, 旨在为今后月季抗灰霉病的分子机制和抗性育种研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成

以种植于云南省农业科学院花卉所种质资源基地的月季品种‘月月粉’为材料, 利用 RNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司) 分别提取接种灰霉菌 0、4、12 和 24 h 月季花瓣的总 RNA, 利用 Nanodrop 2000 检测 RNA 的纯度和浓度, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, -80℃ 保存备用。分别以 1 µg 的总 RNA 为模板, 利用 Prime Script™ RT reagent Kit 进行反转录合成 cDNA 链, 用于 ORF 序列的扩增和 real-time PCR (qPCR) 分析。

1.2 *RcMPK3* 基因 ORF 克隆及生物信息学分析

将转录组中筛选的 *MPK3* 基因序列片段在 NCBI 中进行 BLASTx 比对分析, 发现该片段具有完整的 ORF, 根据 ORF 两端序列设计引物 *RcMPK3* (表 1) 进行 RT-PCR 扩增, 对扩增产物进行回收测序。核酸序列及推断氨基酸序列分别在

NCBI 数据库中用 BLASTn 和 BLASTx 分析; 利用 MEGA 6.0 软件中 ML 法构建系统进化树; 利用 EXPASY(<http://expasy.org/tools/>) 网站中的 TargetP 和 ProtParam 工具对氨基酸序列进行生物信息学分析; 借助在线软件 PSORT 和 Plant-mPLOC 进行亚细胞定位预测; 利用 NetPhos 2.0 server 软件预测磷酸化位点。

表 1 引物信息
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence
RcMPK3	F: ATGGCTGACCTCCCTACCGG R: TCAAGCATACTCAGGATTGAA
QRcMPK3	F: GAGCTTCTTGGGACACCAACCG R: CAATGGCCAACGGATGCACATG
UBC	F: GCCAGAGATTGCCCATATGTA R: TCACAGAGTCCTAGCAGCACA
pRcMPK3	F: TGTGAGTAAGGTTACCGAATTCG- CAATAGATGTTTGGTCTGTG R: GAGCTCGGTACCGGATCCTCAAC- ATTCTATCCACTAGATCAAT

同时, 根据‘月月粉’全基因组信息, 获取 *RcMPK3* 基因的全长和启动子(起始密码子上游 2000 bp 片段)序列, 对其基因结构和启动子包含的顺式作用元件进行分析。

1.3 实时荧光定量分析基因表达模式

1.3.1 外源激素处理

选取生长状态良好、苗龄 18 个月的‘月月粉’扦插苗, 参考 Cao 等^[9]的方法, 分别将处于开花第 2 期的带花枝条瓶插入水(对照, CK)及茉莉酸(Jasmonic acid, JA)(50 μmol/L)、水杨酸(Salicylic acid, SA)(100 μmol/L)和脱落酸(Abscisic acid, ABA)(100 μmol/L)溶液浸泡 24 h。处理完成后, 取枝条顶端的月季花瓣液氮速冻, -80℃冰箱保存, 用于提取 RNA, 不同激素处理后的月季花瓣为 1 个处理, 每个处理 12 支花。

1.3.2 灰霉病菌处理

供试灰霉菌为云南省农业科学院花卉研究所实验室保存的灰霉菌生理小种, 病原菌在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato dextrose agar, PDA)上进行培养。

灰霉菌培养: 在无菌条件下, 将灰霉菌接种于 PDA 培养基上, 密封, 在温度设置为 25℃ ~ 28℃的培养箱中倒置培养 7 d。用无菌水收获培养基上的成熟孢子, 用玻璃棉过滤除去灰霉菌菌丝, 将过滤后的灰霉菌孢子溶液配置成孢子浓度为 1 × 10⁵ conidia/mL 的悬浮液, 现配现用。

选取生长状态良好、苗龄 18 个月的‘月月粉’扦插苗上完全开放的花瓣(开花第 1 d), 用打孔器打成直径 12 mm 的花瓣圆盘, 将花瓣圆盘置于水琼脂培养基(0.4%)中, 每个花瓣圆盘中央滴加 2 μL 灰霉菌孢子悬浮液(1 × 10⁵ conidia/mL), 分别培养 0、4、12、24 h, 每个处理重复 3 次。

1.3.3 qPCR 分析

根据 *RcMPK3* 的 ORF 序列设计 qPCR 引物 QRcMPK3, 以 *UBC* 基因作为内参基因^[10, 11](表 1), 进行 qPCR 分析。qPCR 反应程序为: 94℃ 30 s, 94℃ 10 s, 60℃ 15 s, 共 40 个循环, 每个处理设置 3 个生物学重复。采用 2^{-ΔΔCT} 算法分析数据, 利用 GraphPad 5.0 软件作图。

1.4 基因功能鉴定

以 *EcoR* I 和 *Bam* H I 为酶切位点, 设计带同源臂的引物 pRcMPK3(表 1)扩增目的片段。同时, 利用 *EcoR* I 和 *Bam* H I 内切酶对 pTRV2 质粒进行双酶切, 获得线性化载体, 利用重组试剂盒 Trehef SoSoo Cloning Kit 构建重组质粒, 通过热激法将重组质粒转化入大肠杆菌 *E. coli* DH5α 感受态细胞后, 进行阳性克隆筛选, 测序成功后提取质粒。

利用真空渗透的方法, 将‘月月粉’腋芽浸没在携带重组质粒的农杆菌菌液中(OD = 0.8 ~ 1.0), 25 kPa 抽真空 1 min, 缓慢放气至真空盖可打开, 重复上述操作 1 次, 然后将腋芽嫁接到长势健壮的‘月月粉’植株, 套保鲜袋密封保湿, 每隔 3 天观察腋芽生长状况, 1 周后去掉密封袋, 沉默基因的功能可以在 4 周或 5 周内进行观察^[12]。每组实验至少使用 15 个腋芽, 重复 3 次。

取基因沉默植株和对照组植株的花器官, 用打孔器将花瓣打成直径为 12 mm 的圆盘, 在花瓣圆

盘上接种 2 μL 菌液, 48 h 后对花瓣圆盘病斑直径进行观测。

2 结果与分析

2.1 *RcMPK3* 的 ORF 序列及生物信息学分析

通过 RT-PCR 扩增, 获得了 *RcMPK3* 的全长 ORF 序列, 共 1113 bp, 编码 370 个氨基酸 (图 1)。

对其序列进行分析发现, *RcMPK3* 编码的蛋白属于 TEY 类型的 MAPK, 具有活性位点、ATP 结合位点、多肽底物结合位点、A-loop (T-X-Y 活性位点)、激酶停泊位点等多个功能结构域。用 DNAMAN 软件对不同植物中的 MPK3 蛋白进行多序列比对, 结果显示, *RcMPK3* 含有 MAPK 家族的 11 个保守结构域 (I ~ XI), 且在第 VII 和第 VIII 结构域间含有 T-E-Y 基序, C 末端含有 CD 结构域 (图 2)。NCBI-BLASTp 结果显示, 该基因编码产物与野草莓 (*Fragaria vesca* L.) 相似性达

94.94%, 与水蜜桃 (*Prunus persica* (L.) Batsch) 相似性达 92%, 与苹果相似性达 90.64%。

RcMPK3 蛋白分子质量 92.79 kD, 等电点 5.05, 蛋白稳定系数 38.12, 为稳定蛋白。氨基酸平均亲水系数 0.733, 为疏水性蛋白。亚细胞定位预测结果表明 *RcMPK3* 基因可能在细胞核行使功能。磷酸化位点预测显示, *RcMPK3* 序列包含 31 个能被激酶磷酸化的位点, 其中 11 个 Ser 位点, 12 个 Thr 位点, 8 个 Tyr 位点, 主要能被 UN-SP、SRC、PKC、CDC2、p38MAPK、GSK3、CKII、EGFR、PKA、INSR 以及 RSK 等蛋白酶磷酸化。

根据 *RcMPK3* 氨基酸序列, 与 16 种其他物种同源序列构建系统进化树。结果发现, *RcMPK3* 与野草莓 *FvMPK3* 氨基酸序列亲缘关系最近, 聚为 1 支; 而与水稻 *OsMPK3* 亲缘关系最远 (图 3)。

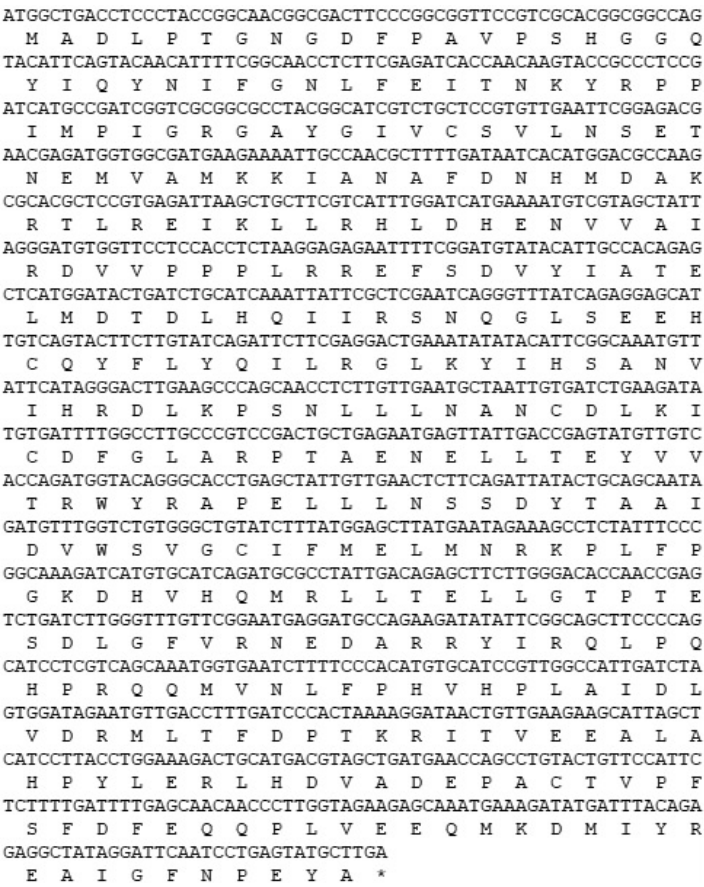


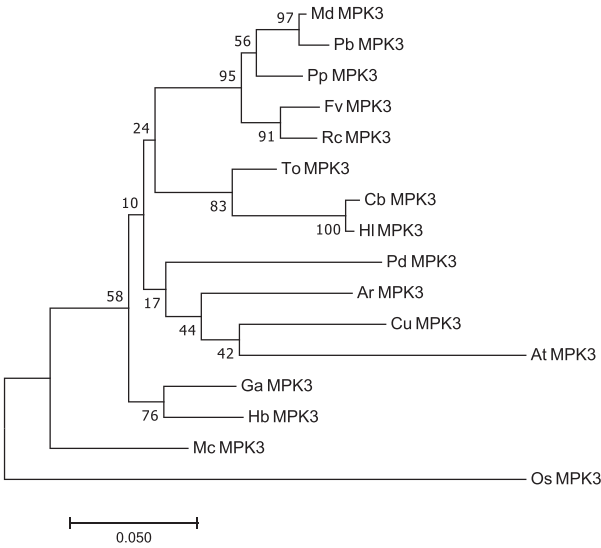
图 1 *RcMPK3* 基因的 ORF 序列及其预测的氨基酸序列
Fig. 1 Open reading frame (ORF) and putative amino acid sequence of *RcMPK3*

Fv_MPK3	MAHLFSGN.....E...LPFAVFSHGGQYIQNIIFGNLFEITNKYRFPPIPIGRGAYGIVCSVINSETREAV	65
Pp_MPK3	MAL.VFSS.....E...LPFAVFSHGGQYIQNIIFGNLFEITNKYRFPPIPIGRGAYGIVCSVINSETREAV	64
Md_MPK3	MAL.LTFN.....E...LPFAVFSHGGQYIQNIIFGNLFEITNKYRFPPIPIGRGAYGIVCSVINSETREAV	64
Pb_MPK3	MAL.LTFN.....E...LPFAVFSHGGQYIQNIIFGNLFEITNKYRFPPIPIGRGAYGIVCSVINSETREAV	64
Cb_MPK3	MAL.ATHNNLFGAAGAFAGGAGPQYTFPAIFSHGGQYIQNIIFGNLFEITNKYRFPPIPIGRGAYGIVCSVINSETREAV	79
Ga_MPK3	MAL.VAFGNAG.....E.QFGDFTIHTGGQYIQNIIFGNLFEITNKYRFPPIPIGRGAYGIVCSVINSETREAV	69
To_MPK3	MAL.VTHSN.....GAGAG.QYSDFTIAISHGGQYIQNIIFGNLFEITNKYRFPPIPIGRGAYGIVCSVINSETREAV	71
Hb_MPK3	MAL.VAFENAG.....E.HFGDFTAIHTGGQYIQNIIFGNLFEITNKYRFPPIPIGRGAYGIVCSVINSETREAV	69
Hl_MPK3	MAL.ATHNNGF.....GAGPAGQYTFPAIFSHGGQYIQNIIFGNLFEITNKYRFPPIPIGRGAYGIVCSVINSETREAV	74
Pd_MPK3	MAL.VAFGNAG.....E.QFGDFTIHTGGQYIQNIIFGNLFEITNKYRFPPIPIGRGAYGIVCSVINSETREAV	64
Cu_MPK3	MAL.VAQVNG.....VQ.GTADFAVFTHGGQYIQNIIFGNLFEITNKYRFPPIPIGRGAYGIVCSVINSETREAV	69
Mc_MPK3	MAL.VGNHN.....AAADFAVFTHGGQYIQNIIFGNLFEITNKYRFPPIPIGRGAYGIVCSVINSETREAV	66
Ar_MPK3	MAL.VN.....SADFAVFSHGGQYIQNIIFGNLFEITNKYRFPPIPIGRGAYGIVCSVINSETREAV	62
At_MPK3	MAL.VN.....E.QYTFPAVFTHGGQYIQNIIFGNLFEITNKYRFPPIPIGRGAYGIVCSVINSETREAV	64
Os_MPK3	MAL.VN.....VAFGFTMTHTGGQYIQNIIFGNLFEITNKYRFPPIPIGRGAYGIVCSVINSETREAV	62
Rc_MPK3	MAL.LFTGN.....E...LPFAVFSHGGQYIQNIIFGNLFEITNKYRFPPIPIGRGAYGIVCSVINSETREAV	64
Consensus	m f hgg ifg f t ky pi pi grg ay giv cs v et e v	
Fv_MPK3	AKKIANAFQNDMDAKRTIREIKLHFDHENVVAIRQVPPHRRRESDDVYIAELMDTDLHQLIRSNQGLSEEHCCQYF	145
Pp_MPK3	AKKIANAFQNDMDAKRTIREIKLHFDHENVVAIRQVPPHRRRESDDVYIAELMDTDLHQLIRSNQGLSEEHCCQYF	144
Md_MPK3	AKKIANAFQNDMDAKRTIREIKLHFDHENVVAIRQVPPHRRRESDDVYIAELMDTDLHQLIRSNQGLSEEHCCQYF	144
Pb_MPK3	AKKIANAFQNDMDAKRTIREIKLHFDHENVVAIRQVPPHRRRESDDVYIAELMDTDLHQLIRSNQGLSEEHCCQYF	144
Cb_MPK3	AKKIANAFQNDMDAKRTIREIKLHFDHENVVAIRQVPPHRRRESDDVYIAELMDTDLHQLIRSNQGLSEEHCCQYF	159
Ga_MPK3	AKKIANAFQNDMDAKRTIREIKLHFDHENVVAIRQVPPHRRRESDDVYIAELMDTDLHQLIRSNQGLSEEHCCQYF	149
To_MPK3	AKKIANAFQNDMDAKRTIREIKLHFDHENVVAIRQVPPHRRRESDDVYIAELMDTDLHQLIRSNQGLSEEHCCQYF	151
Hb_MPK3	AKKIANAFQNDMDAKRTIREIKLHFDHENVVAIRQVPPHRRRESDDVYIAELMDTDLHQLIRSNQGLSEEHCCQYF	149
Hl_MPK3	AKKIANAFQNDMDAKRTIREIKLHFDHENVVAIRQVPPHRRRESDDVYIAELMDTDLHQLIRSNQGLSEEHCCQYF	154
Pd_MPK3	AKKIANAFQNDMDAKRTIREIKLHFDHENVVAIRQVPPHRRRESDDVYIAELMDTDLHQLIRSNQGLSEEHCCQYF	144
Cu_MPK3	AKKIANAFQNDMDAKRTIREIKLHFDHENVVAIRQVPPHRRRESDDVYIAELMDTDLHQLIRSNQGLSEEHCCQYF	149
Mc_MPK3	AKKIANAFQNDMDAKRTIREIKLHFDHENVVAIRQVPPHRRRESDDVYIAELMDTDLHQLIRSNQGLSEEHCCQYF	146
Ar_MPK3	AKKIANAFQNDMDAKRTIREIKLHFDHENVVAIRQVPPHRRRESDDVYIAELMDTDLHQLIRSNQGLSEEHCCQYF	142
At_MPK3	AKKIANAFQNDMDAKRTIREIKLHFDHENVVAIRQVPPHRRRESDDVYIAELMDTDLHQLIRSNQGLSEEHCCQYF	144
Os_MPK3	AKKIANAFQNDMDAKRTIREIKLHFDHENVVAIRQVPPHRRRESDDVYIAELMDTDLHQLIRSNQGLSEEHCCQYF	142
Rc_MPK3	AKKIANAFQNDMDAKRTIREIKLHFDHENVVAIRQVPPHRRRESDDVYIAELMDTDLHQLIRSNQGLSEEHCCQYF	144
Consensus	a k k i a n a f n d m d a k r t i r e i k l h f d h e n v v a i r q v p p h r r e s d d v y i a e l m d t d l h q l i r s n q g l s e e h c c q y f	
Fv_MPK3	YQLRGLKLYHSANLTHRDKPSNLLNANCDLRICDFGLARITAEENLLTEYVVRWYRAPHLLNSSDYAFIDWS	225
Pp_MPK3	YQLRGLKLYHSANLTHRDKPSNLLNANCDLRICDFGLARITAEENLLTEYVVRWYRAPHLLNSSDYAFIDWS	224
Md_MPK3	YQLRGLKLYHSANLTHRDKPSNLLNANCDLRICDFGLARITAEENLLTEYVVRWYRAPHLLNSSDYAFIDWS	224
Pb_MPK3	YQLRGLKLYHSANLTHRDKPSNLLNANCDLRICDFGLARITAEENLLTEYVVRWYRAPHLLNSSDYAFIDWS	224
Cb_MPK3	YQLRGLKLYHSANLTHRDKPSNLLNANCDLRICDFGLARITAEENLLTEYVVRWYRAPHLLNSSDYAFIDWS	239
Ga_MPK3	YQLRGLKLYHSANLTHRDKPSNLLNANCDLRICDFGLARITAEENLLTEYVVRWYRAPHLLNSSDYAFIDWS	229
To_MPK3	YQLRGLKLYHSANLTHRDKPSNLLNANCDLRICDFGLARITAEENLLTEYVVRWYRAPHLLNSSDYAFIDWS	231
Hb_MPK3	YQLRGLKLYHSANLTHRDKPSNLLNANCDLRICDFGLARITAEENLLTEYVVRWYRAPHLLNSSDYAFIDWS	229
Hl_MPK3	YQLRGLKLYHSANLTHRDKPSNLLNANCDLRICDFGLARITAEENLLTEYVVRWYRAPHLLNSSDYAFIDWS	234
Pd_MPK3	YQLRGLKLYHSANLTHRDKPSNLLNANCDLRICDFGLARITAEENLLTEYVVRWYRAPHLLNSSDYAFIDWS	224
Cu_MPK3	YQLRGLKLYHSANLTHRDKPSNLLNANCDLRICDFGLARITAEENLLTEYVVRWYRAPHLLNSSDYAFIDWS	229
Mc_MPK3	YQLRGLKLYHSANLTHRDKPSNLLNANCDLRICDFGLARITAEENLLTEYVVRWYRAPHLLNSSDYAFIDWS	225
Ar_MPK3	YQLRGLKLYHSANLTHRDKPSNLLNANCDLRICDFGLARITAEENLLTEYVVRWYRAPHLLNSSDYAFIDWS	222
At_MPK3	YQLRGLKLYHSANLTHRDKPSNLLNANCDLRICDFGLARITAEENLLTEYVVRWYRAPHLLNSSDYAFIDWS	224
Os_MPK3	YQLRGLKLYHSANLTHRDKPSNLLNANCDLRICDFGLARITAEENLLTEYVVRWYRAPHLLNSSDYAFIDWS	222
Rc_MPK3	YQLRGLKLYHSANLTHRDKPSNLLNANCDLRICDFGLARITAEENLLTEYVVRWYRAPHLLNSSDYAFIDWS	224
Consensus	y q l r g l k y i h s a n l t h r d k p s n l l n a n c d l r i c d f g l a r i t a e e n l l t e y v v r w y r a p h l l n s s d y a f i d w s	
Fv_MPK3	VGCIFELNRRPLFGGQHVHQMRLLELGTETESLGFVRREDARRYIRQLAQHFRQCVKILFHHVHFLAIDIVDM	305
Pp_MPK3	VGCIFELNRRPLFGGQHVHQMRLLELGTETESLGFVRREDARRYIRQLAQHFRQCVKILFHHVHFLAIDIVDM	304
Md_MPK3	VGCIFELNRRPLFGGQHVHQMRLLELGTETESLGFVRREDARRYIRQLAQHFRQCVKILFHHVHFLAIDIVDM	304
Pb_MPK3	VGCIFELNRRPLFGGQHVHQMRLLELGTETESLGFVRREDARRYIRQLAQHFRQCVKILFHHVHFLAIDIVDM	304
Cb_MPK3	VGCIFELNRRPLFGGQHVHQMRLLELGTETESLGFVRREDARRYIRQLAQHFRQCVKILFHHVHFLAIDIVDM	319
Ga_MPK3	VGCIFELNRRPLFGGQHVHQMRLLELGTETESLGFVRREDARRYIRQLAQHFRQCVKILFHHVHFLAIDIVDM	309
To_MPK3	VGCIFELNRRPLFGGQHVHQMRLLELGTETESLGFVRREDARRYIRQLAQHFRQCVKILFHHVHFLAIDIVDM	311
Hb_MPK3	VGCIFELNRRPLFGGQHVHQMRLLELGTETESLGFVRREDARRYIRQLAQHFRQCVKILFHHVHFLAIDIVDM	309
Hl_MPK3	VGCIFELNRRPLFGGQHVHQMRLLELGTETESLGFVRREDARRYIRQLAQHFRQCVKILFHHVHFLAIDIVDM	314
Pd_MPK3	VGCIFELNRRPLFGGQHVHQMRLLELGTETESLGFVRREDARRYIRQLAQHFRQCVKILFHHVHFLAIDIVDM	304
Cu_MPK3	VGCIFELNRRPLFGGQHVHQMRLLELGTETESLGFVRREDARRYIRQLAQHFRQCVKILFHHVHFLAIDIVDM	309
Mc_MPK3	VGCIFELNRRPLFGGQHVHQMRLLELGTETESLGFVRREDARRYIRQLAQHFRQCVKILFHHVHFLAIDIVDM	305
Ar_MPK3	VGCIFELNRRPLFGGQHVHQMRLLELGTETESLGFVRREDARRYIRQLAQHFRQCVKILFHHVHFLAIDIVDM	302
At_MPK3	VGCIFELNRRPLFGGQHVHQMRLLELGTETESLGFVRREDARRYIRQLAQHFRQCVKILFHHVHFLAIDIVDM	304
Os_MPK3	VGCIFELNRRPLFGGQHVHQMRLLELGTETESLGFVRREDARRYIRQLAQHFRQCVKILFHHVHFLAIDIVDM	302
Rc_MPK3	VGCIFELNRRPLFGGQHVHQMRLLELGTETESLGFVRREDARRYIRQLAQHFRQCVKILFHHVHFLAIDIVDM	304
Consensus	v g c i f e l n r r p l f g g q h v h q m r l l e l g t e t e s l g f v r r e d a r r y i r q l a q h f r q c v k i l f h h v h f l a i d i v d m	
Fv_MPK3	LTFTPRTRITVEAALREYLERLHDVDEHCTEFSDFEQPIGEGQKMDIYREKALNEFAA	371
Pp_MPK3	LTFTPRTRITVEAALREYLERLHDVDEHCTEFSDFEQPIGEGQKMDIYREKALNEFAA	370
Md_MPK3	LTFTPRTRITVEAALREYLERLHDVDEHCTEFSDFEQPIGEGQKMDIYREKALNEFAA	370
Pb_MPK3	LTFTPRTRITVEAALREYLERLHDVDEHCTEFSDFEQPIGEGQKMDIYREKALNEFAA	370
Cb_MPK3	LTFTPRTRITVEAALREYLERLHDVDEHCTEFSDFEQPIGEGQKMDIYREKALNEFAA	385
Ga_MPK3	LTFTPRTRITVEAALREYLERLHDVDEHCTEFSDFEQPIGEGQKMDIYREKALNEFAA	375
To_MPK3	LTFTPRTRITVEAALREYLERLHDVDEHCTEFSDFEQPIGEGQKMDIYREKALNEFAA	377
Hb_MPK3	LTFTPRTRITVEAALREYLERLHDVDEHCTEFSDFEQPIGEGQKMDIYREKALNEFAA	375
Hl_MPK3	LTFTPRTRITVEAALREYLERLHDVDEHCTEFSDFEQPIGEGQKMDIYREKALNEFAA	380
Pd_MPK3	LTFTPRTRITVEAALREYLERLHDVDEHCTEFSDFEQPIGEGQKMDIYREKALNEFAA	370
Cu_MPK3	LTFTPRTRITVEAALREYLERLHDVDEHCTEFSDFEQPIGEGQKMDIYREKALNEFAA	375
Mc_MPK3	LTFTPRTRITVEAALREYLERLHDVDEHCTEFSDFEQPIGEGQKMDIYREKALNEFAA	371
Ar_MPK3	LTFTPRTRITVEAALREYLERLHDVDEHCTEFSDFEQPIGEGQKMDIYREKALNEFAA	360
At_MPK3	LTFTPRTRITVEAALREYLERLHDVDEHCTEFSDFEQPIGEGQKMDIYREKALNEFAA	370
Os_MPK3	LTFTPRTRITVEAALREYLERLHDVDEHCTEFSDFEQPIGEGQKMDIYREKALNEFAA	368
Rc_MPK3	LTFTPRTRITVEAALREYLERLHDVDEHCTEFSDFEQPIGEGQKMDIYREKALNEFAA	370
Consensus	l t f t p r t r i t v e a a l r e y l e r l h d v d e h c t e f s d f e q p i g e g q k m d i y r e k a l n e f a a	

MdMPK3: XP_008385257.2, 苹果 (*Malus domestica* Borkh., nom. con. prop.); PbMPK3: XP_009352415.1, 白梨 (*Pyrus bretschneideri* Rehd.); PpMPK3: XP_007205387.1, 水蜜桃 (*Prunus persica* (L.) Batsch); FvMPK3: XP_004294685.1, 野草莓 (*Fragaria vesca* L.); CsMPK3: XP_030504674.1, 大麻 (*Cannabis sativa* L.); GaMPK3: XP_017616979.1, 棉花 (*Gossypium arboreum* L.); HlMPK3: AEV89968.1, 啤酒花 (*Humulus lupulus* L.); ToMPK3: PO001557.1, 异色山麻黄 (*Trema orientale* (L.) Blume.); ArMPK3: GFZ13195.1, 猕猴桃 (*Actinidia rufa* Ann. Mus. Bot. Lugduno-Batavi.); RcMPK3: XP_024157102.1, 月季 (*Rosa chinensis* Jacq. Obs. Bot.); McMPK3: XP_022159047.1, 苦瓜 (*Momordica charantia* L.); PdMPK3: KAF9844928.1, 美洲黑杨 (*Populus deltoides* Marshall, Arbust. Amer.); HuMPK3: XP_021278051.1, 哥伦比亚锦葵 (*Herrania umbtrical* R. E. Schult.); OsMPK3: ABH01189.1, 水稻 (*Oryza sativa* L.); AtMPK3: CAD5324945.1, 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh); CuMPK3: GAY38257.1, 蜜柑 (*Citrus unshiu* Blanco, Fl. Filip.).

图 2 月季 RcMPK3 保守结构域分析及与其他植物同源序列比对分析

Fig. 2 Conserved domains and homologous sequence alignment of RcMPK3 with other plants



图中每个分枝上的数字表示 1000 次重复搜索的自展值。
Numbers on major branches indicate bootstrap estimates for 1000 replicates.

图 3 基于 MPK3 蛋白序列构建的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree based on MPK3 sequences

2.2 *RcMPK3* 基因组全长和启动子序列分析

提取 *RcMPK3* 基因组全长和起始密码子上游 2000 bp 启动子序列, 进行序列分析, 结果发现 *RcMPK3* 由 6 个外显子和 5 个内含子, 6 个外显子长度分别为 158、130、138、333、183 和 171 bp, 第 2 和第 4 内含子较长, 长度分别为 254 和 449 bp。利用在线工具 PlantCARE 进行顺式元件分析, 提取了响应激素和逆境相关的 10 类顺式元件, 与植物激素响应相关的顺式元件有 4 类, 分别为响应脱落酸、茉莉酸甲酯、水杨酸和赤霉素的顺式元件; 与生长

发育相关的顺式元件有胚乳表达元件和光响应元件; 胁迫响应相关元件主要包括: 厌氧诱导响应、缺氧响应、低温响应和防御及胁迫响应元件。

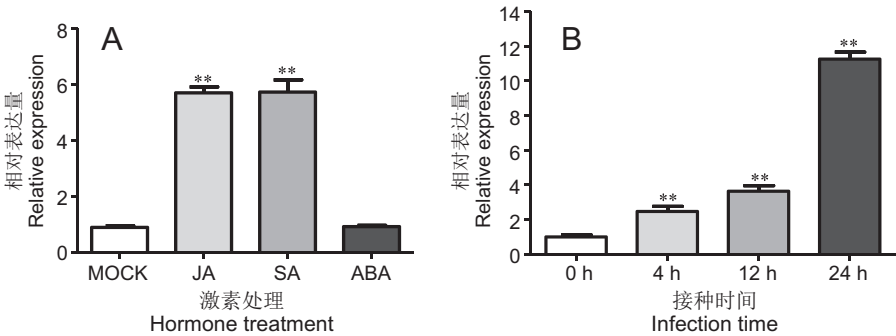
2.3 *RcMPK3* 对不同激素及灰霉病菌侵染的表达响应

为了解 *RcMPK3* 对不同激素处理的响应情况, 分别用 SA、JA 和 ABA 处理月季花器官 24 h, 检测 *RcMPK3* 的表达水平。结果发现, SA 和 JA 处理后, *RcMPK3* 基因表达上调, 分别为对照水平的 5.45 和 5.23 倍。ABA 处理后, *RcMPK3* 基因表达无明显变化(图 4: A)。

为分析 *RcMPK3* 响应灰霉病菌的表达模式, 取生长健康的‘月月粉’花瓣接种灰霉病菌, 利用 qPCR 技术检测基因的表达水平。结果表明, *RcMPK3* 基因在接种灰霉病菌 4、12 和 24 h 后表达量持续显著增高, 分别达到对照组的 2.4、3.89 和 11.15 倍(图 4: B), 表明 *RcMPK3* 参与了月季对灰霉病菌胁迫的响应。

2.4 *RcMPK3* 的功能验证

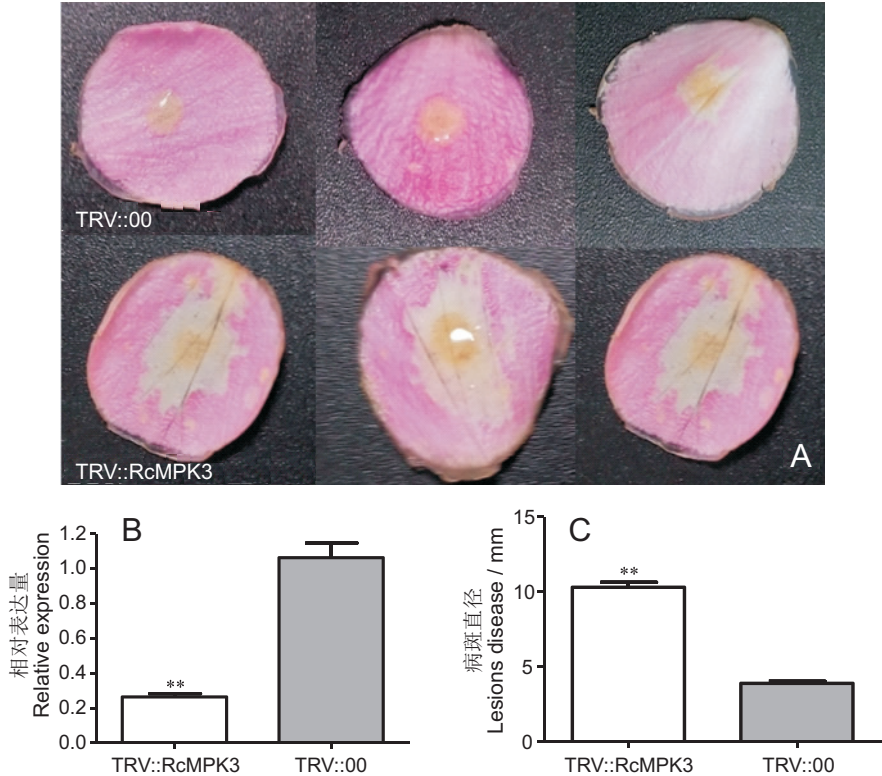
基因沉默株系中, *RcMPK3* 基因表达量仅为对照组的 20%, 显著低于对照组(图 5: B), 表明 TRV::RcMPK3 的引入降低了内源靶基因的表达。对灰霉病菌的抗性鉴定表明, 在接种灰霉病菌 48 h 后, 基因沉默株系花瓣病斑直径约为对照组的 3 倍(图 5: A、C), 表明 *RcMPK3* 基因的抑制表达提高了‘月月粉’对灰霉病菌的敏感性, 推断 *RcMPK3* 可能正调控月季对灰霉病菌的抗性。



** 表示处理与对照在 $P < 0.01$ 水平差异显著。下同。
** indicates significant differences at $P < 0.01$ level. Same below

图 4 *RcMPK3* 响应 JA、SA、ABA (A) 和灰霉病菌 (B) 的表达模式分析

Fig. 4 Expression pattern analysis of *RcMPK3* in response to JA, SA, ABA (A), and *B. cinerea* (B)



A: 基因沉默后花瓣形态变化; B: *RcMPK3* 基因相对表达量; C: 接种 *B. cinerea* 后花瓣病斑直径
A: Changes in phenotype after gene silencing; B: Relative expression of *RcMPK3*; C: Quantification of *B. cinerea* disease lesions on TRV::RcMPK3 and TRV::00-inoculated rose petal discs.

图 5 *RcMPK3* 对 *B. cinerea* 抗性鉴定

Fig. 5 Identification of *RcMPK3* resistance to *B. cinerea*

3 讨论

对 *RcMPK3* 基因序列进行生物信息学分析表明, 其编码产物具有 11 个典型的 MAPKs 保守基序, 在第Ⅶ和第Ⅷ保守结构域之间存在 TEY 基序, 属于 A 亚族, 与茶树 (*Camellia sinensis* (L.) O. Ktze.) CsMAPK3^[13]、玉米 (*Zea mays* L.) ZmMPK3-1^[14]、拟南芥 AtMPK3^[2] 序列具有较高的相似性。

对外显子和内含子的研究有助于我们了解基因结构和功能上的差异^[15]。不同物种同家族间 MPK3 基因组全长具有较大差异。*RcMPK3* 有 6 个外显子和 5 个内含子。而木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) *MeMPK3* 含有 4 个内含子和 5 个外显子^[16], *ZmMPK3* 有 4 个内含子和 5 个外显子^[17], 表明由于物种的不同, MPK3 基因全长结构存在一定差异, 这与该基因在植物间的进化与功能分化有关。基因表达水平和模式受植物启动子序列中核心启动元件和顺式作用元件协同调节。本研究

RcMPK3 启动子序列含有 SA、MeJA、GA 和 ABA 逆境激素响应元件, 并可被 SA 和 JA 诱导显著表达。

在植物中, MAPK 级联反应参与包括免疫在内的许多生物过程。MPK3/MPK6 参与各种免疫反应的激活, 其失活导致对病原体的防御受损^[18-20]。Wang 等^[21] 研究表明油菜 (*Brassica napus* L.) *BnaMPK3* 正向调控油菜与核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 的相互作用。Su 等^[22] 研究表明, MPK3/MPK6 级联能够通过促进防御和抑制光合作用的双重作用, 从而在植物免疫中协调其生长和防御。Sidonskaya 等^[23] 研究发现 MPK3 和 MPK6 是植物与线虫 (*Heterodera schachtii*) 相互作用的重要调节因子, MPK3 和 MPK6 通过与磷酸酶 AP2C1 以及 AP2C1 的协同作用确保了植物防御被及时激活, 表明 MPK3 在植物参与病虫害免疫过程中具有重要作用。本研究发现, 灰霉菌胁迫过程中, 月季中 *RcMPK3* 的表达量随灰霉菌接种时间的延长呈持续显著增高, 且该基因的抑制表达增

强了月季对灰霉病菌的敏感性, 表明 *RcMPK3* 在月季对灰霉病菌的抗性反应中具有积极作用。

参考文献:

- [1] Cakir B, Kilickaya O. Mitogen-activated protein kinase cascades in *Vitis vinifera*[J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 556.
- [2] Ichimura K, Shinozaki K, Tena G. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature[J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(7): 301–308.
- [3] Wang K, Shao Z, Guo F, Wang K, Zhang Z. The mitogen-activated protein kinase kinase *TaMKK5* mediates immunity via the *TaMKK5-TaMPK3-TaERF3* module[J]. *Plant Physiol*, 2021, 187(4): 2323–2337.
- [4] Shan D, Wang C, Zheng X, Hu Z, Zhu Y, *et al.* MKK4-MPK3-WRKY17-mediated salicylic acid degradation increases susceptibility to glomerella leaf spot in apple[J]. *Plant Physiol*, 2021, 186(2): 1202–1219.
- [5] Zhou J, Wang X, He Y, Sang T, Wang P, *et al.* Differential phosphorylation of the transcription factor WRKY33 by the protein kinases CPK5/CPK6 and MPK3/MPK6 cooperatively regulates camalexin biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2020, 32(8): 2621–2638.
- [6] Han X, Li S, Zhang M, Yang L, Liu Y, *et al.* Regulation of *GDSL* lipase gene expression by the MPK3/MPK6 cascade and its downstream *WRKY* transcription factors in *Arabidopsis* immunity [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2019, 32(6): 673–684.
- [7] Xu J, Meng J, Meng X, Zhao Y, Liu J, *et al.* Pathogen-responsive *MPK3* and *MPK6* reprogram the biosynthesis of indole glucosinolates and their derivatives in *Arabidopsis* immunity[J]. *Plant Cell*, 2016, 28(5): 1144–1162.
- [8] Yang L, Zhang Y, Guan R, Li S, Xu X, *et al.* Co-regulation of indole glucosinolates and camalexin biosynthesis by CPK5/CPK6 and MPK3/MPK6 signaling pathways[J]. *J Integr Plant Biol*, 2020, 62(11): 1780–1796.
- [9] Cao X, Yan H, Liu X, Li D, Sui M, *et al.* A detached petal disc assay and virus-induced gene silencing facilitate the study of *Botrytis cinerea* resistance in rose flowers [J]. *Hortic Res*, 2019, 6: 136.
- [10] Maiko K, Thomas D. Identification of superior reference genes for data normalization of expression studies via quantitative PCR in hybrid roses (*Rosa hybrida*) [J]. *BMC Res Notes*, 2011, 4(1): 518–527.
- [11] Qiu XQ, Jian H, Wang QG, Tang KX, Bao MZ. Expression pattern analysis of four *MLO* genes from rose [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 2015, 140(4): 333–338.
- [12] Yan H, Zhang Z, Magnard JL, Boachon B, Baudino S, Tang K. Virus-induced gene silencing in rose flowers[J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2172: 223–232.
- [13] 曹红利, 陈丹, 叶乃兴, 郭雅玲, 岳川. 茶树 *CsMAPK3* 的全长克隆及其逆境表达分析[J]. 园艺学报, 2017, 44(11): 2203–2214.
Cao HL, Chen D, Ye NX, Guo YL, Yue C. Cloning and abiotic stress expression analysis of *CsMAPK3* gene in tea plant [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2017, 44 (11): 2203–2214.
- [14] Stanko V, Giuliani C, Retzer K, Djamei A, Wahl V, *et al.* Timing is everything: highly specific and transient expression of a MAP kinase determines auxin-induced leaf venation patterns in *Arabidopsis*[J]. *Mol Plant*, 2014, 7(11): 1637–1652.
- [15] Xu G, Guo C, Shan H, Kong H. Divergence of duplicate genes in exon-intron structure [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(4): 1187–1192.
- [16] Yan Y, Wang L, Ding Z, Tie W, Ding X, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of the mitogen-activated protein kinase gene family in cassava[J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1294.
- [17] Liu YK, Zhang D, Wang L, Li DQ. Genome-wide analysis of mitogen-activated protein kinase gene family in maize [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2013, 31(6): 1446–1460.
- [18] Abuqamar S, Moustafa K, Tran LS. Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*[J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2017, 37(2): 262–274.
- [19] Thulasi Devendrakumar K, Li X, Zhang Y. MAP kinase signalling: interplays between plant PAMP- and effector-triggered immunity[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(16): 2981–2989.
- [20] Meng X, Xu J, He Y, Yang KY, Mordorski B, *et al.* Phosphorylation of an *ERF* transcription factor by *Arabidopsis* *MPK3/MPK6* regulates plant defense gene induction and fungal resistance[J]. *Plant Cell*, 2013, 25(3): 1126–1142.
- [21] Wang Z, Bao LL, Zhao FY, Tang MQ, Chen T, *et al.* *BnaMPK3* is a key regulator of defense responses to the devastating plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* in oil-seed rape[J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 91.
- [22] Su J, Yang L, Zhu Q, Wu H, He Y, *et al.* Active photosynthetic inhibition mediated by MPK3/MPK6 is critical to effector-triggered immunity[J]. *PLoS Biol*, 2018, 16(5): e2004122.
- [23] Sidonskaya E, Schweighofer A, Shubchynskyy V, Kammerhofer N, Hofmann J, *et al.* Plant resistance against the parasitic nematode *Heterodera schachtii* is mediated by MPK3 and MPK6 kinases, which are controlled by the MAPK phosphatase AP2C1 in *Arabidopsis*[J]. *J Exp Bot*, 2016, 67(1): 107–118.

(责任编辑: 李惠英)