

## 研究报告

## Research Report

# 酵母双杂交系统筛选马铃薯 StMAPKK1 互作蛋白及其生物信息学分析

廖钰秋<sup>1</sup> 王芳芳<sup>1</sup> 朱熙<sup>2</sup> 张宁<sup>1\*</sup> 司怀军<sup>1,3</sup>

1 甘肃农业大学生命科学技术学院, 兰州, 730070; 2 甘肃农业大学农学院, 兰州, 730070; 3 甘肃省干旱生境作物学省部共建国家重点实验室培育基地, 兰州, 730070

\* 通信作者, ningzh@gsau.edu.cn

**摘要** 促丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联反应是参与植物生长发育、激素及胁迫的响应信号通路中重要而复杂的信号网络之一。促分裂原活化蛋白激酶激酶(Mitogen-activated protein kinase kinase, MAPKK)是其主要成员之一,是该级联反应中位于通路中间、对信号传递起着收集和发散的关键作用的激酶。已有研究表明马铃薯(*Solanum tuberosum* L.) *StMAPKK1* 基因响应干旱胁迫。本研究采用同源重组的克隆方式构建了 *StMAPKK1* 的诱饵载体 pGBKT7-*StMAPKK1*, 通过酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)双杂交系统筛选马铃薯 cDNA 文库,共得到 5 种 *StMAPKK1* 互作蛋白,并利用小规模杂交回转变验证对互作真实性进行了验证。通过生物信息学分析鉴定这 5 种 *StMAPKK1* 互作蛋白分别为水解酶(水解 O-糖基化合物)、RING-H2 亚家族 RHE 蛋白、氰酸酯酶、ARF GTPase 活化因子以及一个含有 C2 结构域的蛋白。研究结果为进一步研究马铃薯 *StMAPKK1* 所参与信号通路及其生物功能提供理论依据。

**关键词** 马铃薯, *StMAPKK1*, 酵母双杂交, 互作蛋白

## Screening and Bioinformatics Analysis of Proteins Interacting with *StMAPKK1* in Potato by Yeast Two-Hybrid System

Liao Yuqiu<sup>1</sup> Wang Fangfang<sup>1</sup> Zhu Xi<sup>2</sup> Zhang Ning<sup>1\*</sup> Si Huaijun<sup>1,3</sup>

1 College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, 730070; 2 College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou, 730070; 3 Gansu Provincial Key Laboratory of Aridland Crop Science, Lanzhou, 730070

\* Corresponding author, ningzh@gsau.edu.cn

DOI: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0008

**Abstract** Mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade reaction is one of important and complex signal networks involved in plant growth and development, hormone and stress response. As one of its main members, mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) is located in the middle of the cascade reaction and plays a key role in signal collection and divergence. There were shown that potato (*Solanum tuberosum* L.) *StMAPKK1* (PGSC-0003DMT400000744) gene responded to drought stress. Therefore, *StMAPKK1* gene was firstly selected to screen its interacting protein. In this study, the bait vector pGBKT7-*StMAPKK1* was constructed by homologous recombination and used to screen potato cDNA library by yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) two-hybrid system. Five *StMAPKK1*-interacting proteins, hydrolase (hydrolyzing O-glycosyl compound), RING-H2 subgroup RHE protein, cyanate hydratase, ARF GTPase activator, and a C2 domain-containing protein, were obtained through this

本文首次发表在 International Journal of Clinical Case Reports 上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2020 年 6 月 4 日; 接受日期: 2020 年 6 月 6 日; 发表日期: 2020 年 6 月 13 日

引用格式: Liao Y.Q., Wang F.F., Zhu X., Zhang N., Si H.J., 2020, Screening and bioinformatics analysis of proteins interacting with *StMAPKK1* in potato by yeast two-hybrid system, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 18(16): 1-7 (10.5376/mpb.cn.2020.18.0016)) (廖钰秋, 王芳芳, 朱熙, 张宁, 司怀军, 2020, 酵母双杂交系统筛选马铃薯 *StMAPKK1* 互作蛋白及其生物信息学分析, 分子植物育种, 18(16): 1-7 (10.5376/mpb.cn.2020.18.0016))

screening and were identified by bioinformatics analysis, and the interaction was verified by small-scale hybridization verification. The results provided theoretical basis for further study on the signal pathway and biological function of potato StMAPKK1.

**Keywords** Potato, StMAPKK1, Yeast two-hybrid, Interacting protein

促分裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联反应是一种广泛存在于真核生物中、在进化过程中高度保守的生物信号转导模块(MAPK Group, 2002)。植物中, MAPK 信号途径几乎参与各种生长发育过程以及多种生物与非生物胁迫的应激反应,使细胞内形成庞大复杂、相互沟通交叉的生物信号转导网络,为植物生长发育及应对生长发育过程中的胁迫提供了足够的信息快速集散的基本条件。

MAPK 级联反应通过其主要的三种激酶,促分裂原活化蛋白激酶激酶激酶(MAPKKK)、促分裂原活化蛋白激酶激酶(MAPKK)和促分裂原活化蛋白激酶(MAPK),在特定的基序位点上磷酸化作用于某些成员的上游和下游形成级联信号通路(Iftikhar et al., 2017)。其中, MAPKKs 成员数量最少,可分为 A、B、C、D 四个亚族。MAPKKs 是一种双重激酶,既可能被上游 MAPKKK 磷酸化激活,也可通过磷酸化反应激活下游 MAPK。植物中 MAPKK 响应干旱胁迫, AtMAPKKK18-AtMCK3-AtMPK1/2 参与 ABA 诱导依赖的抗旱性调控(Li et al., 2017),拟南芥中过表达 *ZmMCK1* 或 *ZmMCK4* 均增强了抗旱性(Cai et al., 2014; Kong et al., 2011)。GhMCK3 可调节气孔大小及根毛生长的方式增强棉花的抗旱性(Wang et al., 2016)。另外,有研究发现, *OsMCK1* 参与水稻盐胁迫信号传导(Wang et al., 2014), *OsMCK6* 在低温和盐胁迫中起作用(Xie et al., 2012)。

已有研究对马铃薯 MAPKKs 家族基因进行了鉴定(刘雪, 2017),获得 5 个 *StMAPKK* 基因,并根据番茄同源性分析命名为 *StMAPKK1* (PGSC0003DMT-400000744)、*StMAPKK2* (PGSC0003DMT400023739)、*StMAPKK3* (PGSC0003DMT400014637)、*StMAPKK4* (PGSC0003DMT400083995) 和 *StMAPKK5* (PGSC0003DMT400039329)。不同处理下(包括 4°C, 45°C, 20% PEG, 200 mmol/L NaCl, 10 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 μmol/L MeJA, 100 μmol/L SA, 100 μmol/L ABA)马铃薯 *StMAPKK* 基因定量结果发现 *StMAPKK1* 基因在干旱胁迫下表达量显著升高。故选择 *StMAPKK1* 基因为实验研究对象,通过酵母双杂交技术筛选获得与 StMAPKK1 互作的蛋白质,并采用生物信息学方法进行鉴定分析,从而探寻马铃薯中 *StMAPKK1* 基因

在干旱胁迫下作用的信号通路。

## 1 结果与分析

### 1.1 酵母双杂交诱饵载体 pGBKT7-StMAPKK1 的构建

马铃薯 *StMAPKK1* 基因(PGSC0003DMT4000-00744)转录序列全长为 1 666 bp,根据同源重组引物设计原则设计引物扩增的插入片段会在插入片段 5' 和 3' 末端分别带有和线性化载体两端对应的同源序列 21 bp,故产物大小约为 1 708 bp,与电泳结果相符(图 1A)。pGBKT7 质粒大小为 7 303 bp,经限制性内切酶 *Pst* I 和 *Nde* I 双酶切获得线性质粒,大小约为 7 270 bp,电泳检测符合预期大小(图 1B)。

重组产物转化至感受态大肠杆菌,涂布于 LB 固体平板(50 mg/L Kan),挑取 6 个单菌落进行菌液 PCR 鉴定,均在 1 708 bp 左右有明显条带(图 1C)。*StMAPKK1* 基因中在 572 bp 和 582 bp 处有 *Nde* I 酶切位点, *Pst* I 和 *Nde* I 双酶切重组质粒 pGBKT7-StMAPKK1 应会获得三个片段大小分别约为 7 270 bp、1 126 bp 和 572 bp,电泳结果(图 1D)与预期结果相符。同时经测序结果比对,表明 *StMAPKK1* 基因已成功插入 pGBKT7 载体。

### 1.2 酵母双杂交诱饵载体的毒性和自激活活性检测

将含有 pGBKT7 空载体与 pGBKT7-StMAPKK1 诱饵载体的 Y187 酵母涂布于单缺培养基 SD/-Trp/X-α-gal 上培养,观察可得到两种菌株生长数量大致相同(图 3),说明该诱饵载体对酵母细胞没有毒性。同时两种菌株在二缺平板 SD/-Trp/-His/X-α-gal 和 SD/-Trp/-Ade/X-α-gal 上均未生长,说明该菌株没有自激活活性,无法单独激活下游报告基因。

### 1.3 阳性克隆小规模杂交验证

将诱饵蛋白与文库的杂交液涂布于 50 个 QDO 培养基上培养,共挑选直径较大的单菌落 406 个进行初步 X-α-gal 染色鉴定筛选,其中 210 个菌落在 48 h 内生长并显蓝色,视为阳性克隆,阳性率为 51.72%。经电泳检测及测序,共鉴定 5 个不同的 StMAPKK1 互作蛋白,分别命名为 C1~C5,分别占比为 87%、2.9%、4.8%、2.9%和 2.9%。

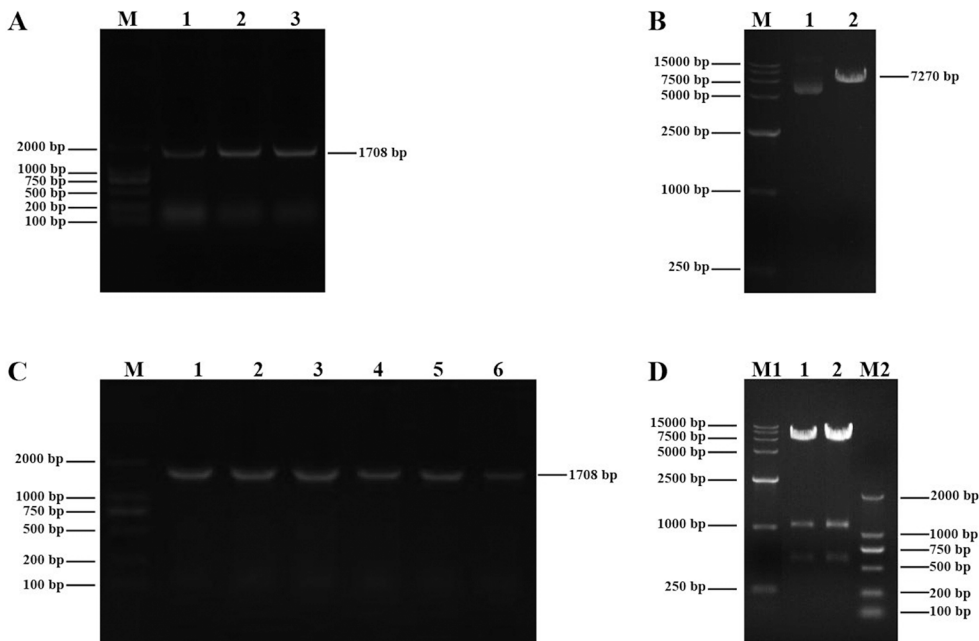


图 1 酵母双杂交诱饵载体 pGBKT7-*St*MAPKK1 的构建

注: A: 马铃薯 *St*MAPKK1 基因扩增, M: Trans2K DNA 分子标记, 1~3: 马铃薯 *St*MAPKK1 基因 PCR 产物; B: pGBKT7 质粒双酶切线性化, M: DL15000 DNA 分子标记, 1: pGBKT7 载体质粒, 2: pGBKT7 经 *Pst* I 和 *Nde* I 限制性内切酶双酶切后所得线性化载体; C: 诱饵载体 pGBKT7 重组质粒的菌液 PCR 鉴定, M: Trans2K DNA 分子标记, 1~6: 单菌落菌液 PCR 产物; D: 诱饵载体 pGBKT7 重组质粒的双酶切鉴定, M1: DL15000 DNA 分子标记, 1: 载体酶切片段及 *St*MAPKK1 基因克隆片段混合物电泳条带, 2,3: *Pst* I 和 *Nde* I 双酶切产物, M2: Trans2K DNA 分子标记

Figure 1 Construction of yeast two-hybrid bait vector pGBKT7-*St*MAPKK1

Note: A: Amplification of *St*MAPKK1 gene, M: Trans2K DNA molecular Marker, 1~3: PCR product of *St*MAPKK1 gene; B: The double enzyme digestion linearization of pGBKT7 plasmid, M: DL15000 DNA molecular Marker, 1: pGBKT7 vector plasmid, 2: *Pst* I and *Nde* I restriction endonuclease digestion to obtain the linear vector of pGBKT7; C: Identification of recombinant plasmid pGBKT7-*St*MAPKK1 by PCR, M: Trans2K DNA molecular Marker, 1~6: PCR product of single colony solution; D: Identification of the recombinant plasmid pGBKT7-*St*MAPKK1 digestion by *Nde* I and *Pst* I, M1: DL15000 DNA molecular Markers, 1 and 2: Products of pGBKT7-*St*MAPKK1 digestion by *Nde* I and *Pst* I, M2: Trans2K DNA molecular Markers

随机挑选 5 个 *St*MAPKK1 互作蛋白基因质粒, 重新转入 AH109 酵母中, 与含有诱饵载体的 Y187 分别进行杂交, 涂布于 QDO/X- $\alpha$ -Gal 培养基进行培养。培养两天后, 5 个点种位置均长出蓝色深浅不一的菌落(图 4)。说明 5 个阳性克隆基因均能通过小规模杂交的回转验证, 其互作关系真实可信。

#### 1.4 阳性克隆基因鉴定

通过对阳性克隆测序比对分析, 得到 5 个马铃薯 *St*MAPKK1 互作蛋白 C1~C5: 水解酶(水解 O-糖基化合物)、RING-H2 亚家族 RHE 蛋白、氰酸酯酶、ARF (ADP-ribosylation factor) GTPase 活化因子以及含有 C2 结构域的蛋白。采用生物信息学方法获取其基因序列基本信息和注释。

## 2 讨论

经对阳性克隆测序结果比对, 共获得 5 种马铃

薯 *St*MAPKK1 互作蛋白: 水解酶(水解 O-糖基化合物)、RING-H2 亚家族 RHE 蛋白、氰酸酯酶、ARF GTPase 活化因子以及含有 C2 结构域的蛋白。

其中, 互作蛋白 C1 为水解酶(水解 O-糖基化合物), 另一注解为半乳糖醇-蔗糖半乳糖基转移酶, 属于糖苷水解酶家族 36 (Glycoside hydrolase family 36) 中 11 个亚家族(GH36A 到 GH36K)的 GH36C 亚族, 该家族所含成员又可称为棉子糖合成酶(Raffinose synthase, RS)或种子自吸蛋白(Seed imbibition protein I, Sip I)。棉子糖合成酶(EC 2.4.1.82)是将蔗糖导入棉子糖低聚糖途径的关键酶, 在植物种子获得抗旱能力与种子寿命延长方面起着重要作用(Peterbauer et al., 2002)。有研究表明, 棉子糖合成酶在玉米种子中是棉子糖系列寡糖(Raffinose family oligosaccharides, RFO)分解的唯一原因(Andreas et al., 2008)。而黄瓜叶片和果实中低温和外源激素脱落酸(ABA)可诱导 CsRS 表达, RS 活性和棉子糖含量逐渐增加(Sui et al.,



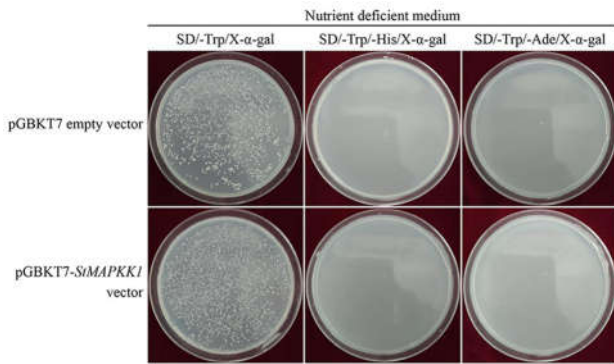


图3 酵母双杂交诱饵载体 pGBKT7-StMAPKK1 的毒性检测与自激活活性检测

Figure 3 Detection of toxicity and self-activating activity of yeast two-hybrid bait vector pGBKT7-StMAPKK1

及胞内蛋白(Cho and Stahelin, 2006)。水稻中一个含有 C2 结构域的蛋白质 OsPBP1 被证明可能通过 Ca<sup>2+</sup> 和磷脂信号通路从而调控花粉育性(Yang et al., 2008)。

本实验中,通过酵母双杂交技术筛选获得的马铃薯 StMAPKK1 互作蛋白与预期目标结果有一定差距,未筛选到 MAPKs 级联反应中其它类型激酶,如 MAPKKK 和 MAPK。有研究表明,除典型的 MAPK 途径 MAPKKK-MAPKK-MAPK 外,还存在有其它级联途径,可能和其它信号通路途径有交叉传递。

### 3 材料与方 法

#### 3.1 实验材料

马铃薯四倍体栽培品种 '紫花白' 的酵母双杂交 cDNA 文库 (梁丽娜, 2017)、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株 Y187、AH109, 大肠杆菌 (*Escherichia*

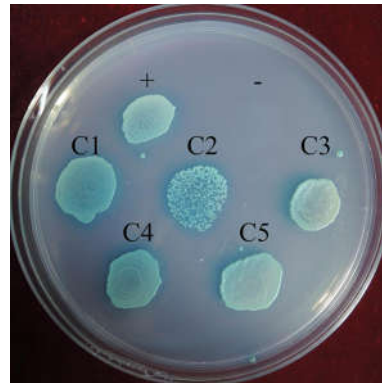


图4 阳性克隆的小规模杂交验证

Figure 4 Small-scale hybridization verification of positive clones  
注: +: 阳性对照 AH109 (pGADT7-RecT)×Y187(pGBKT7-53);  
 -: 阴性对照 AH109 (pGADT7-RecT)×Y187(pGBKT7-Lam);  
 C1~C5: 阳性克隆编号

Note: +: Positive control AH109 (pGADT7-RecT)×Y187 (pGBKT7-53); -: Negative control AH109 (pGADT7-RecT) ×Y187 (pGBKT7-Lam); C1~C5: Numbers of positive clones

*coli*) 菌株 DH5α 及诱饵载体 pGBKT7 均由甘肃农业大学生命科学技术学院实验室保存。

#### 3.2 酵母双杂交诱饵载体 pGBKT7-StMAPKK1 的构建

使用 *Pst* I 和 *Nde* I 限制性内切酶将载体 pGBKT7 线性化并进行凝胶回收。PCR 反应扩增马铃薯 *StMAPKK1* 基因目的片段反应体系为: 2×Power *Taq* PCR Master MIX 10 μL, 马铃薯 '大西洋' 叶片 cDNA 模板 1 μL, 10 μmol/L *StMAPKK1*-F (5'-TCAGAGGAGGACCTGCATATGGTTGCCTGGAAGCAATTCACA-3')、*StMAPKK1*-R (5'-CTAGTTATGCGGCCG

表1 马铃薯 StMAPKK1 互作蛋白信息

Table 1 Details information of proteins interacting with StMAPKK1

克隆	基因编号	PGSC 编号	基因名称注释	基因全长(bp)	蛋白质长度(aa)	染色体位置
Clone	Gene ID	PGSC ID	Annotation of gene name	Full length of gene (bp)	Protein length (aa)	Chromosomal location
C1	102586320	PGSC0003	水解酶, 水解 O-糖基化合物	4 178	864	chr07:4096440..4101254
		DMG400030891	Hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds			
C2	102591415	PGSC0003	RING-H2 亚家族 RHE 蛋白	921	306	chr01:57283292..57284878
		DMG400011326	RING-H2 subgroup RHE protein			
C3	102578903	PGSC0003	氰酸酯酶	3 550	162	chr09:56757059..56761063
		DMG400017160	Cyanate hydratase			
C4	102593804	PGSC0003	ARF GTPase 活化因子	2 253	164	chr00:33717961..33720534
		DMG400007759	ARF GTPase activator			
C5	102585714	PGSC0003	含有 C2 结构域蛋白	3 074	167	chr00:22575898..22579255
		DMG400023218	C2 domain-containing protein			

CTGCAGTTCATTGAAAGGTCTCTAAATTGATCT C-3') (下划线部分为载体同源序列)各 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 sec,62 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 67 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min;4 $^{\circ}$ C 保存。电泳检测并进行凝胶回收,片段大小为 1708 bp。将回收所得线性化载体与 *StMAPKK1* 基因 PCR 产物根据 Vazyme 公司的 ClonExpress<sup>®</sup> II One Step Cloning Kit 说明书计算构建同源重组反应体系,反应程序为 37 $^{\circ}$ C 30 min 后 4 $^{\circ}$ C 保存。将重组产物通过热激法转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,涂布于含有 50 mg/L Kan 的 LB 培养基 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单菌落进行菌液 PCR 检测及质粒双酶切检测并测序。

### 3.3 酵母双杂交诱饵载体的毒性和自激活活性检测

将 pGBKT7-*StMAPKK1* 诱饵载体质粒和 pGBKT7 空载体质粒通过聚乙二醇/醋酸锂法分别转化酵母菌 Y187。转化产物分别涂 SD/-Trp 平板,30 $^{\circ}$ C 培养 1~2 天。挑取 2~3 mm 大小、从 30 $^{\circ}$ C 生长 2 天后长出的 pGBKT7-*StMAPKK1* 诱饵载体和 pGBKT7 空载体单菌落各一个,于装有 500  $\mu$ L SD/-Trp 的液体培养基中混匀,各取 80  $\mu$ L 涂布在 SD/-Trp/X- $\alpha$ -Gal,SD/-His/-Trp/X- $\alpha$ -Gal 和 SD/-Ade/-Trp/X- $\alpha$ -Gal 缺陷培养基上,剩余的菌液 4 $^{\circ}$ C 保存。将涂好的平板放在 30 $^{\circ}$ C 培养 3~4 d。根据菌落生长情况判断诱饵载体是否具有毒性和自激活活性。

### 3.4 诱饵蛋白与酵母文库的杂交

挑取诱饵载体单菌落至 50 mL SDO/-Trp/Kan (20  $\mu$ g/mL)培养基中,30 $^{\circ}$ C 230 r/min 过夜培养(16~24 h),离心后用 5 mL SDO/-Trp 液体培养基重悬沉淀。取诱饵载体 Y187 菌液 5 mL 和文库 AH109 菌液 1 mL 于 2 L 三角瓶中。加入 50 mL 2 $\times$ YPDA/Kan (50  $\mu$ g/mL),30 $^{\circ}$ C 摇床低速(30~50 r/min)孵育 20~24 h。把杂交液 5 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀用 10 mL 0.5 $\times$ YPDA/Kan 重悬。将重悬液涂布于 50 个 QDO 培养基(SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp),每个板 80  $\mu$ L,30 $^{\circ}$ C 培养 5~7 d,进行高严谨互作筛选。挑选较大(直径>2 mm)的单菌落点种到涂布有 100  $\mu$ L X- $\alpha$ -Gal 的 QDO 培养基进行初步染色鉴定筛选。在选择培养基 QDO/X- $\alpha$ -Gal 上可以水解底物 X- $\alpha$ -Gal 并呈现明显的蓝色,视为阳性克隆。将阳性克隆进行 PCR 鉴定,引物为根据 pGADT7 载体多克隆位点两端序列设计的 pGADT7-F (5'-TAATACGACTCACTATAGGGCGA GCG-3'),pGADT7-R (5'-GTGAACTTGCGGGGTTT TTCAGTAT-3')。所得 PCR 产物经电泳检测并送苏

州金唯智生物科技有限公司测序。

### 3.5 阳性克隆小规模杂交验证

参照徐文琳等(2003)的方法提取阳性单克隆酵母质粒。挑选含正确 ORF 的阳性质粒转化酵母 AH-109 感受态细胞,再与含有诱饵载体的酵母 Y187 重新杂交。AH109 (pGADT7-RecT) $\times$ Y187 (pGBKT7-53)和 AH109 (pGADT7-RecT) $\times$ Y187 (pGBKT7-Lam)分别用作阳性和阴性对照。上述杂交液各取 20  $\mu$ L 滴在新鲜的 QDO/X- $\alpha$ -Gal 平板上使其形成圆形菌斑,于 30 $^{\circ}$ C 黑暗培养,观察生长及变色情况,验证互作的真实性。

### 3.6 阳性克隆基因的生物信息学分析鉴定

阳性克隆测序结果于 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、马铃薯 PGSC ([http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/pgsc\\_download.shtml](http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/pgsc_download.shtml))以及 Phytozome v12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)中的马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.)数据库进行 Blast 比对分析,得到 *StMAPKK1* 互作蛋白的蛋白名称,染色体位置及其全长基因和蛋白质序列。

### 作者贡献

廖钰秋是本研究的实验设计者和实验研究的执行人,进行数据整理及论文初稿的写作;王芳芳和朱熙参与部分实验;张宁和司怀军是项目的负责人,指导实验设计、数据统计、论文写作与修改。全体作者都同意最终的文本。

### 致谢

本研究由国家自然科学基金(No.31960444)和甘肃农业大学干旱生境作物学重点实验室开放基金课题(No.GSCS-2019-Z03)共同资助。

### 参考文献

- Andreas B., Peterbauer T., Hofmann J., and Richter A., 2008, Enzymatic breakdown of raffinose oligosaccharides in pea seeds, *Planta*, 228(1): 99-110
- Baldacci-Cresp F., Moussawi J., Leplé J., Van A.R., Kohler A., Candiracci J., Twyffels L., Spokevicius A., Bossinger G., Laurans F., Brunel N., Vermeersch M., Boerjan W., Jaziri M. E., and Baucher M., 2015, PtaRHE1, a *Populus tremula*  $\times$  *Populus alba* RING-H2 protein of the ATL family, has a regulatory role in secondary phloem fibre development, *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 82(6): 978-990

- Cai G., Wang G., Wang L., Liu Y., Pan J., and Li D., 2014, A maize mitogen-activated protein kinase kinase, ZmMKK1, positively regulated the salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*, *Journal of Plant Physiology*, 171 (12): 1003-1016
- Cho W., and Stahelin R.V., 2006, Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1761(8): 838-849
- Iftikhar H., Naveed N., Virk N., Bhatti M.F., and Song F., 2017, In silico analysis reveals widespread presence of three gene families, MAPK, MAPKK and MAPKKK, of the MAPK cascade from crop plants of Solanaceae in comparison to the distantly-related syntenic species from Rubiaceae, coffee, *Peer J.*, 5: e3255
- Kito K., Yamane K., Yamamori T., Matsuhira H., Tanaka Y., and Takabe T., 2018, Isolation, functional characterization and stress responses of raffinose synthase genes in sugar beet, *J. Plant Biochem. Biot.*, 27(1): 36-45
- Kong X.P., Pan J.W., Zhang M.Y., Xing X., Li D., Zhou Y., Liu Y., Li D.P., and Li D.Q., 2011, ZmMKK4, a novel group C mitogen-activated protein kinase kinase in maize (*Zea mays*), confers salt and cold tolerance in transgenic *Arabidopsis*, *Plant Cell Environ.*, 34(8): 1291-1303
- Li Y.Y., Cai H.X., Liu P., Wang C.Y., Gao H.Y., Wu C.A., Yan K., Zhang S.Z., Huang J.G., and Zheng C.C., 2017, *Arabidopsis* MAPKKK18 positively regulates drought stress resistance via downstream MAPKK3, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 484(2): 292-297
- Liang L.N., 2017, Yeast cDNA library construction and ERF transcription factor screening of potato (*Solanum tuberosum* L.) under drought stress, Thesis for M.S., College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Supervisor: Zhang N., pp.21-30 (梁丽娜, 2017, 干旱胁迫下马铃薯酵母 cDNA 文库构建及 ERF 转录因子筛选, 硕士学位论文, 甘肃农业大学生命科学技术学院, 导师: 张宁, pp.21-30)
- Liu X., 2017, Identification of mitogen activated protein kinases kinases genes and screening of drought-related functional genes in potato, Thesis for M.S., College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Supervisor: Si H.J., pp.37-40 (刘雪, 2017, 马铃薯 MAPKK 基因鉴定及其抗旱相关功能基因筛选. 硕士学位论文, 甘肃农业大学生命科学技术学院, 导师: 司怀军, pp.37-40)
- MAPK Group, 2002, Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature, *Trend Plant Sci.*, 7(7): 301-308
- MartínezGarcía M., GarcidueñasPiña C., Guzmán P., MartínezGarcía M., GarcidueñasPiña C., and Guzman P., 1996, Gene isolation in *Arabidopsis thaliana* by conditional overexpression of cDNAs toxic to *Saccharomyces cerevisiae*: identification of a novel early response zinc-finger gene, *Molecular & General Genetics Mgg.*, 252(5): 587-596
- Peterbauer T., Mach L., Mucha J., and Richter A., 2002, Functional expression of a cDNA encoding pea (*Pisum sativum* L.) raffinose synthase, partial purification of the enzyme from maturing seeds, and steady-state kinetic analysis of raffinose synthesis, *Planta*, 215(5): 839-846
- Rothman J.E., and Wieland F.T., 1996, Protein sorting by transport vesicles, *Science*, 272(5259): 227-234
- Salinas-Mondragón R.E., Garcidueñas-Piña C., and Guzmán P., 1999, Early elicitor induction in members of a novel multi-gene family coding for highly related RING-H2 proteins in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol. Biol.*, 40(4): 579-90
- Sui X.L., Meng F.Z., Wang H.Y., Wei Y.X., Li R.F., Wang Z.Y., Hu L.P., Wang S.H., and Zhang Z.X., 2012, Molecular cloning, characteristics and low temperature response of raffinose synthase gene in *Cucumis sativus* L., *J. Plant Physiol.*, 169(18): 1883-1891
- Sung Y.C., and Fuchs J.A., 1988, Characterization of the Cyn operon in *Escherichia coli* K12, *J. Biol. Chem.*, 263 (29): 14769-14775
- Thomas C.S., and Rizo J., 1996, Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic, *Neuron*, 17 (3): 379-388
- Wang C., Lu W.J., He X.W., Wang F., Zhou Y.L., Guo X.L., and Guo X.Q., 2016, The cotton mitogen-activated protein kinase kinase 3 functions in drought tolerance by regulating stomatal responses and root growth, *Plant Cell Physiol.*, 57 (8): 1629-1642
- Wang F.Z., Jing W., and Zhang W.H., 2014, The mitogen-activated protein kinase cascade MKK1-MPK4 mediates salt signaling in rice, *Plant Sci.*, 227: 181-189
- Xie G.S., Kato H., and Imai R., 2012, Biochemical identification of the *OsMKK6~OsMPK3* signalling pathway for chilling stress tolerance in rice, *Biochem. J.*, 443(1): 95-102
- Xu W.L., Liao Z.Y., Wang C.L., Yu L.H., Wang X.X., Yi S.Y., Zhang C.G., and Qian L.J., 2003, The improvement of some methods involved in yeast two-hybrid experiments, *Shengwu Jishu Tongbao (Letters in Biotechnology)*, 14(5): 372-374 (徐文琳, 廖志勇, 王春丽, 余利红, 王新兴, 尹昭云, 张成岗, 钱令嘉, 2003, 酵母双杂交相关方法的改良及应用, *生物技术通讯*, 14(5): 372-374)
- Yang W.Q., Lai Y., Li M.N., Xu W.Y., and Xue Y.B., 2008, A novel C2-domain phospholipid-binding protein, OsPBP1, is required for pollen fertility in rice, *Mol. Plant*, 1(5): 770-785