Chinese Journal of Biotechnology
CSTR: 32114.14.j.cjb.240516
DOI: 10.13345/j.cjb.240516
Feb. 25, 2025, 41(2): 736-752
http://journals.im.ac.cn/cjbcn
©2025 Chin J Biotech, All rights reserved

·农业生物技术·

芥菜 MAPK 基因家族成员鉴定及其响应根肿菌侵染的表达分析

徐楚[1,2]，王海平[2]，宋江萍[2]，张晓辉[2]，贾会霞[2]，韩嘉琪[1,2]，李芝洁[2]，李森[1]，阳文龙[2*]

1 山西农业大学 园艺学院，山西 晋中 030801
2 中国农业科学院蔬菜花卉研究所 蔬菜生物育种全国重点实验室，北京 100081

徐楚，王海平，宋江萍，张晓辉，贾会霞，韩嘉琪，李芝洁，李森，阳文龙. 芥菜MAPK基因家族成员鉴定及其响应根肿菌侵染的表达分析[J]. 生物工程学报, 2025, 41(2): 736-752.
XU Chu, WANG Haiping, SONG Jiangping, ZHANG Xiaohui, JIA Huixia, HAN Jiaqi, LI Zhijie, LI Sen, YANG Wenlong. Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of MAPK genes in response to *Plasmodiophora brassicae* infection in *Brassica juncea*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 736-752.

摘　要：芸薹属根肿菌(*Plasmodiophora brassica*)侵染引起的根肿病蔓延会严重影响芥菜[*Brassica juncea* (L.) Czern.]的产量和品质。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)级联作为一种高度保守的信号通路，在植物的生物和非生物胁迫中发挥重要作用。为了挖掘芥菜抗根肿病相关的MAPK基因，本研究对芥菜进行全基因组鉴定，并对芥菜MAPK基因家族的系统进化以及基因结构等进行生物信息学分析。筛选鉴定的 66 个 BjuMAPK 基因不均匀分布在 17 条染色体上。在基因组尺度上，发现基因的串联重复导致了芥菜 MAPK 基因数目增多。同一亚族成员之间具有相似的基因结构，不同亚族间差异较大。预测的顺式作用元件与植物激素、抗逆性以及植物的生长发育相关，表达分析显示 *BjuMAPK02*、*BjuMAPK15*、*BjuMAPK17* 和 *BjuMAPK19* 等基因在根肿菌侵染芥菜后具有不同的响应模式。以上结果为进一步研究 BjuMAPK 基因在芥菜应对根肿病生物胁迫中的功能奠定了理论基础。

关键词：芥菜；丝裂原活化蛋白激酶；根肿病；表达分析

资助项目：国家现代农业产业技术体系项目(CARS-24-A-01)；农业农村部作物种质资源安全保存项目(2024NWB037)；中国农业科学院创新工程项目(CAAS-ASTIP-2024-IVFCAAS)
This work was supported by the China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-24-A-01), the Safe Preservation Project of Crop Germplasm Resources of Ministry of Agriculture and Rural Affairs (2024NWB037), and the Science and Technology Innovation Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ASTIP-2024-IVFCAAS).
*Corresponding author. E-mail: yangwenlong@caas.cn
Received: 2024-06-25; Accepted: 2024-08-28; Published online: 2024-08-29

Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of MAPK genes in response to *Plasmodiophora brassicae* infection in *Brassica juncea*

XU Chu[1,2], WANG Haiping[2], SONG Jiangping[2], ZHANG Xiaohui[2], JIA Huixia[2], HAN Jiaqi[1,2], LI Zhijie[2], LI Sen[1], YANG Wenlong[2*]

1 College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, Shanxi, China
2 State Key Laboratory of Vegetable Biobreeding, Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: In recent years, the spread of clubroot disease caused by *Plasmodiophora brassicae* infection has seriously affected the yield and quality of *Brassica juncea* (L.) Czern.. The cascade of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), a highly conserved signaling pathway, plays an important role in plant responses to both biotic and abiotic stress conditions. To mine the MAPK genes related to clubroot disease resistance in *B. juncea*, we conducted a genome-wide analysis on this vegetable, and we analyzed the phylogenetic evolution and gene structure of the MAPK gene family in mustard. The 66 BjuMAPK genes identified by screening the whole genome sequence of *B. juncea* were unevenly distributed on 17 chromosomes. At the genomic scale, tandem repeats led to an increase in the number of MAPK genes in *B. juncea*. It was found that members of the same subfamily had similar gene structures, and there were great differences among different subfamilies. These predicted *cis*-acting elements were related to plant hormones, stress resistance, and plant growth and development. The expression of *BjuMAPK02*, *BjuMAPK15*, *BjuMAPK17*, and *BjuMAPK19* were down-regulated or up-regulated in response to *P. brassicae* infection. The above results lay a theoretical foundation for further studying the functions of BjuMAPK genes in *B. juncea* in response to the biotic stress caused by clubroot disease.

Keywords: *Brassica juncea*; mitogen-activated protein kinases; clubroot disease; expression analysis

芥菜(*Brassica juncea*)是我国重要的鲜食和加工蔬菜，种植过程中常常遭受根肿病危害，造成巨大的经济损失[1]。根肿病是十字花科作物的一种重要的土传病害[2]。受害植株的形态和生理状态会发生显著变化，最终形成瘿，严重影响植株的正常生长发育[3]。十字花科根肿病是由芸薹属根肿菌(*Plasmodiophora brassicae*)侵染引起的[4]，其休眠孢子可在土壤中越冬，并且能够在土壤中存活 20 年以上，即使在无合适寄主的条件下，这些孢子也能够存活 15 年以上[5-6]。由于根肿病的病原菌无法通过体外培养获得，因此限制了对根肿病以及其病原菌的深入研究[7]。目前，根肿病的综合防治可以分为生物防治、农业防治和化学防治，这些防治方法在一定程度上起到抑制作用却无法根治[8]。因此，迫切需要培育抗根肿病的芥菜品种[5]，从根源出发揭示芥菜对根肿病的响应机制并挖掘抗根肿病基因，这对于选育优良抗性新品种进而控制病害具有现实意义。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)级联是真核生物进化过程中高度保守的信号转导系统[9-10]。该信号转导模块包括 MAPK 激酶激酶(MAP kinase kinase kinase, MAPKKK)、MAPK 激酶(MAP kinase kinase, MAPKK 或 MKK)和 MAPK 这 3 个组分[11-12]。细胞膜受体蛋白感知细胞外刺激后激活 MAPKKKs，MAPKKKs 通过磷酸化 MKKs 保守环中的丝氨酸/苏氨酸激活 MKKs，MKKs 为双特异性蛋白激酶，同时磷酸化 MAPKs 保守环 T-X-Y 基序中的苏氨酸和酪氨酸残基进而激活 MAPKs[13]。随后，活化的 MAPKs 进一步磷酸化下游底物的丝氨酸/苏氨酸残基[12],下游底物包括激酶、酶、转录因子和染色质重塑因子等应答因子[12,14-16]。该级联反应通过逐级磷酸化将外界环境信号传递并放大至细胞内[15]，从而引起植株对外界刺激的响应[17-18]。

MAPK 信号途径在植物的生物与非生物胁迫响应中发挥重要作用。MAPK3、MAPK4、MAPK6 可以被病原体激发子激活，调控拟南芥先天免疫[19-21]。MAPK3/MAPK6 级联能够调节多种防御反应，包括防御基因的诱导[22]、超敏反应[23]以及植物抗毒素的合成[24]。水稻中，*OsBWMK1*、*OsMAPK3*、*OsMAPK5* 和 *OsMAPK8* 被证实与抗病性、激素信号及非生物胁迫相关[25-27]。MAPKKKε-MKK2-MPK1/MPK2/MPK3 参与番茄抗病反应[28]。紫花苜蓿中，MAPK 级联反应能被真菌诱导子激活，也参与非生物胁迫响应[29]。烟草中，MAPK 基因能够被各种生物胁迫与防御激素激活[30]。在油菜中，50% BraMAPK 基因的表达响应根肿菌的感染[31]。综上所述，MAPK 级联反应在植物的抗病防御过程中发挥重要作用，但目前关于 MAPK 基因抗芥菜根肿病的研究报道较少。

本研究通过鉴定芥菜 MAPK 同源序列(BjuMAPKs)，探究其基因结构、保守基序、顺式作用元件和进化关系，利用实时荧光定量 PCR 检测 BjuMAPK 基因在接种根肿菌后的转录水平，以期为芥菜根肿病抗性关键基因的挖掘和抗病品种的选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料及处理

芥菜抗病品种‘C101’和感病品种‘A270’均种植于中国农业科学院蔬菜花卉研究所种质资源课题组人工气候室预先准备好无菌营养土的营养钵中。在芥菜生长至两叶一心时进行根肿菌接种，对照接种同样体积的无菌水。病原菌是来自河南南阳的受根肿菌 4 号生理小种感染的大白菜病根，菌液的制备和接种参考吴道军[32]的方法，利用血球计数板观察计算菌液浓度，最终将菌液的浓度调整为 1×10^8 个孢子/mL。分别在接种根肿菌的第 0 天、第 4 天(显微镜下观察为根肿菌侵入根毛)、第 8 天(根肿菌侵入皮层)、第 19 天(开始出现根瘤)、第 42 天(苗期根瘤膨大鉴定期)这 5 个时期的芥菜根系进行取样，每个时间点每个处理取 3 个生物学重复，且每个时期均有未接种的材料作为对照。液氮速冻后存放于 –80 ℃冰箱中保存备用。

1.2 芥菜 MAPK 基因全基因组鉴定

从 TAIR 网站(https://www.arabidopsis.org/)下载拟南芥的全基因组蛋白质氨基酸序列，根据已有的拟南芥 MAPK 基因名称，利用 TBtools 工具提取出 20 条拟南芥 MAPK 基因家族蛋白序列。在 BRAD (http://brassicadb.cn/) 网站下载芥菜的蛋白数据库 V1.0，通过 TBtools 进行 BLAST 比对搜索，阈值设置为(E-value<$1\times e^{-20}$)，删除重复序列，得到芥菜的 MAPK 基因家族的同源蛋白序列，利用 Pfam (http://pfam.xfam.org/)在线检测其 MAPK 保守结构域(PF00069)，使用 HMMER

(https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan/)进行序列比对得到含有保守结构域的蛋白质氨基酸序列，使用Batch CD-Search (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi/)进一步验证候选蛋白是否含有 MAPK 保守结构域，手动删除不完整或者缺失 MAPK 保守结构域的基因，最终获得异源四倍体芥菜的 66 个 MAPK 基因。

1.3 芥菜 MAPK 基因编码蛋白的理化性质分析

利用Expasy网站中的ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/)工具预测 MAPK 蛋白的氨基酸的大小、分子量、等电点及不稳定系数等。利用 Expasy 网站中的 ProtScale (http://web.expasy.org/protscale/)工具预测蛋白的亲水或疏水性。通过 SPOMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/)在线软件预测分析蛋白质的 α-螺旋、β-折叠、扩展链等二级结构。利用 WOLF PSORT (https://wolfpsort.hgc.jp/)网站对芥菜 MAPK 蛋白进行亚细胞定位预测。

1.4 芥菜 MAPK 家族系统发育进化树的构建和基因结构分析

利用 MEGA 7.0 中的 ClustalW 功能进行芥菜和拟南芥的蛋白氨基酸多重序列比对，删除比对前后差异大的序列部分，采用邻接法，Boostrap 值设置为 1 000 进行建树。通过 MEME (http://meme-suite.org/)在线软件预测分析芥菜 MAPK 基因的保守基序(motif)，motif 选择 10 个。利用 TBtools 对进化树与保守基序进行绘图展示。

1.5 芥菜 MAPK 基因染色体定位分析与顺式作用元件分析

利用TBtools进行芥菜全基因组蛋白的自身blast，得到基因串联重复文件，将基因组(general feature format, GFF)注释文件和基因 ID 文件以及基因串联重复文件进行可视化，绘制 MAPK 基因在染色体中的位置分布图。

利用TBtools提取芥菜MAPK基因上游2 kb序列，使用Plantcare (http://bioinformatics. psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)在线预测启动子顺式作用元件并进行手动整理，保留含有基因 ID、顺式作用元件在启动子上的位置以及功能域的 text 文件，利用 TBtools (basic biosequence view)对启动子顺式作用元件进行可视化展示。

1.6 芥菜 MAPK 家族成员实时荧光定量 PCR 分析

利用宝林科(北京)生物科技有限公司的 Omega Plant RNA Kit (植物 RNA 小量提取试剂盒)提取 RNA，然后用凯弗瑞生物技术有限公司的 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)反转录试剂盒合成 cDNA。基于前人转录组测序研究[33]，筛选与抗逆相关的 BjuMAPK 基因，利用 NCBI 在线软件 Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)、BIORUN 在线工具(https://www.biorun.com/tools/101.html) 和 Primer5.0 软件设计引物，所用引物见表 1，以 *GAPDH* 作为内参基因，荧光定量 PCR 仪(ABI QuantStudio 6 Flex)检测各基因的表达情况，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算芥菜 MAPK 基因在不同样品中的相对表达量，分别利用 Excel 2019 和 OriginPro 8.5 进行数据处理和图表制作。

2 结果与分析

2.1 芥菜 MAPK 基因家族成员鉴定

利用拟南芥的 20 个 MAPK 基因的氨基酸序列搜索叶芥基因组数据库(http://brassicadb.cn/#/Download/)，筛选出 69 个候选的 MAPK 同源基因，进一步利用 Pfam、Batch CD-Search、HMMER 结构域搜索检验 MAPK 候选基因是否含有完整结构域，手动去除结构不完整的 3 个 MAPK 基因，最终鉴定得到 66 个芥菜 MAPK 基因，并根据基因在染色体上的位置命名(表 2)。

表 1 本研究所用实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers for quantitative reverse transcription polymerase chain reaction used in this study

Primer	Forward sequence (5′→3′)	Reverse sequence (5′→3′)	PCR product (bp)
GAPDH	CAAGAAGGCTATCAAGGAGGAAT	TCACGAAGTTGTCACTCAATGC	151
MAPK02	GAATAGCGGCAAAAGTGGGC	GGCTCGAAAGAAACACGTCG	144
MAPK04	AGGGTGCATTTTTGCAGAGC	CCTCACCCTTCCAATGGCTT	127
MAPK07	GATTGGCTACTCACGGAGGTCAGT	CTCTTGGCGTCGATGATGTTGTCA	205
MAPK15	ACGTCATGCTTCCTCCTTCG	ACTGGTAATGCTCAGGCGTC	123
MAPK17	ACTTGTGTGCAACGGAGAGT	GCAGATGGTTCCACAACACG	154
MAPK19	CATGCTACCTCCTTCTCGCC	CACATTGGCTGCGTGAACAT	172
MAPK26	GGAACGTAACTCCCCACCTG	CTCTGATGAGCACACCCGTT	170
MAPK30	TGCTCTAGACACGCACACTG	CCTGGTTGCGTCAGAGACAT	182
MAPK32	ACACGCTGATCCTCTCGCTCTT	GGCTCCGAACCATCCAAGTATTCTT	270
MAPK35	AGGACGAAGAAGACGAAGAAGAGGA	CGACTGGCTTCACCGTATTCTGTAA	202
MAPK37	ACTACACCGCGACCTGAAAC	ACTCCGAGCAGTTGAGAAGC	167
MAPK38	TACCTAGGGCTTGCGTTGTG	CACGCGGTCTCTCATCTCTG	117
MAPK40	CTACTCGCTGGTATCGTGCC	CGGTGGAGTGCCTAGAAAGT	182
MAPK45	CCCAAGCGGAGTTGATCAGT	CTGATGATGAGCACACCCGT	137
MAPK46	CATTGATGTCTGGTCAGTTGG	TCTCTCTGATCATTCGCTCC	172
MAPK57	AAATAGCGGCAAAAGTGGGC	GCCAGGTTGAGCATTTGAGG	106
MAPK58	CGAGTTGATCCACCAAACGG	CCTCGGCCTATGGGTTTGAT	113
MAPK60	ACATAAGGCAACTTCCACCGTATCC	CTGGCTCATCGCTAATGTCGTGTAG	183

2.2 蛋白理化性质分析

异源四倍体芥菜 MAPK 基因家族中的基因编码的氨基酸数量为 217–629 aa，Expasy-ProtScale 预测芥菜的 BjuMAPKs 均为疏水性蛋白；BjuMAPK49 的分子质量最小，为 29 606.36 Da, BjuMAPK11 的分子质量最大，为 70 087.34 Da；BjuMAPKs 理论等电点在 4.90–9.41 范围内，有 40 个(占 MAPK 蛋白总数的 60.29%) MAPK 蛋白的氨基酸序列理论等电点在酸性范围内；不稳定系数小于 40 的 MAPK 家族成员有 17 个，大部分属于不稳定蛋白。芥菜 66 个 MAPK 蛋白的氨基酸序列均含有 α-螺旋、随机卷曲、扩展链和 β-转角，各 MAPK 基因编码蛋白质二级结构中 α-螺旋含量为 35.50%–48.37%、随机卷曲含量为 28.53%–48.08%、扩展链含量为 6.91%–20.09%，β-转角含量为 3.72%–7.88%。这表明 α-螺旋和随机卷曲是 BjuMAPK 蛋白的 2 类主要二级结构。

2.3 系统发育进化树的构建和基因结构分析

将 66 个 BjuMAPK 蛋白序列与 20 个 AtMPK 蛋白序列进行多序列比对并构建系统发育进化树，结果显示，66 个芥菜 BjuMAPKs 被分成 a、b、c、d 四组，a 和 c 组的 BjuMAPKs 具有 TEY 基序，b 组成员中除 *BjuMAPK28* 具有非特征基序 TQY，其余成员均具有 TEY 特征基序，d 组的 BjuMAPKs 具有 TDY 基序(图 1)。4 个亚族中包含成员数量不一，a 组成员包括 7 个 BjuMAPK 基因和 2 个 AtMPK 基因；b 组成员包括 21 个 BjuMAPK 基因和 6 个 AtMPK 基因；c 组成员包括 8 个 BjuMAPK 基因和 4 个 AtMPK 基因；d 组成员包括 30 个 BjuMAPK 基因和 8 个 AtMPK 基因。芥菜的 MAPK 基因家族成员与拟南芥的 MPK 家族成员的相似程度较高。

表 2　芥菜 66 个 BjuMAPK 家族成员特征

Table 2　Characteristics of the 66 BjuMAPKs in *Brassica juncea*

Gene name	Gene ID	Chromosome	Molecular weight (Da)	Theoretical isoelectric point	Instability index	Alpha helix (%)	Extended strand (%)	Beta turn (%)	Random coil (%)
BjuMAPK01	BjuOA01G30030	A01	42 548.22	6.19	40.17	46.22	14.32	6.22	33.24
BjuMAPK02	BjuOA01G40850	A01	67 471.13	9.36	44.16	39.30	11.61	4.48	44.61
BjuMAPK03	BjuOA02G37940	A02	55 699.59	6.64	46.29	45.29	12.50	4.51	37.70
BjuMAPK04	BjuOA03G09360	A03	64 057.00	8.89	41.04	42.22	10.20	5.01	42.58
BjuMAPK05	BjuOA03G23080	A03	68 959.06	9.41	38.22	39.27	11.55	4.95	44.22
BjuMAPK06	BjuOA03G23650	A03	44 902.34	5.21	48.74	43.54	14.43	7.09	34.94
BjuMAPK07	BjuOA03G31060	A03	42 529.48	5.85	41.58	43.70	15.28	5.36	35.66
BjuMAPK08	BjuOA04G02350	A04	45 125.75	5.44	44.36	43.22	14.07	4.09	38.62
BjuMAPK09	BjuOA04G02360	A04	44 744.47	5.31	44.62	41.79	15.64	4.36	38.21
BjuMAPK10	BjuOA04G35890	A04	42 589.85	8.03	41.50	41.13	14.52	5.65	38.71
BjuMAPK11	BjuOA05G02970	A05	70 087.34	9.37	41.42	39.32	12.94	4.37	43.37
BjuMAPK12	BjuOA05G03620	A05	44 897.39	5.28	49.23	42.35	11.99	5.61	40.05
BjuMAPK13	BjuOA05G05640	A05	42 562.84	8.06	44.79	43.01	15.05	4.84	37.10
BjuMAPK14	BjuOA05G17910	A05	65 376.92	9.22	37.77	36.22	12.82	5.03	45.93
BjuMAPK15	BjuOA05G32760	A05	68 153.13	7.16	48.00	44.78	11.28	4.71	39.23
BjuMAPK16	BjuOA05G35880	A05	66 775.46	9.29	36.55	36.49	12.67	5.24	45.61
BjuMAPK17	BjuOA06G00090	A06	67 589.12	9.30	41.07	36.39	11.02	4.51	48.08
BjuMAPK18	BjuOA06G06270	A06	42 523.25	6.67	42.99	43.90	13.28	6.23	36.59
BjuMAPK19	BjuOA06G13130	A06	65 448.02	6.11	38.69	43.89	12.05	5.16	38.90
BjuMAPK20	BjuOA06G20520	A06	42 601.82	5.79	36.39	43.24	12.97	6.49	37.30
BjuMAPK21	BjuOA06G40610	A06	55 641.61	6.51	46.14	43.12	13.14	5.34	38.40
BjuMAPK22	BjuOA07G01990	A07	42 276.93	6.64	34.13	46.47	15.22	7.34	30.98
BjuMAPK23	BjuOA07G24690	A07	51 672.26	5.74	44.48	44.35	14.86	6.21	34.59
BjuMAPK24	BjuOA07G29720	A07	65 318.92	7.01	45.69	45.58	10.23	4.51	39.69
BjuMAPK25	BjuOA09G12040	A09	53 760.92	7.22	34.36	39.53	20.09	5.98	34.40
BjuMAPK26	BjuOA09G24100	A09	55 459.51	7.25	44.57	43.21	14.61	4.94	37.24
BjuMAPK27	BjuOA09G28190	A09	42 853.93	5.52	41.42	45.58	15.55	4.56	34.32
BjuMAPK28	BjuOA09G52800	A09	40 718.47	5.17	48.84	44.38	11.24	3.93	40.45
BjuMAPK29	BjuOA09G52820	A09	45 729.19	6.17	41.28	39.75	14.00	5.50	40.75
BjuMAPK30	BjuOA09G60700	A09	65 327.04	6.72	43.28	44.81	9.34	4.33	41.52
BjuMAPK31	BjuOA09G66880	A09	43 047.13	5.00	47.50	45.01	14.82	5.66	34.50
BjuMAPK32	BjuOA10G21210	A10	64 260.35	8.95	40.80	40.90	11.57	4.80	42.70
BjuMAPK33	BjuOB01G00780	B01	42 527.72	7.64	41.99	44.35	14.78	6.45	34.41
BjuMAPK34	BjuOB01G02130	B01	44 703.08	5.44	44.28	42.31	14.87	5.90	36.92
BjuMAPK35	BjuOB01G39120	B01	69 334.37	7.18	46.24	45.03	12.75	3.81	38.41
BjuMAPK36	BjuOB01G42250	B01	66 654.29	9.29	38.26	38.72	14.14	6.06	41.08
BjuMAPK37	BjuOB02G02700	B02	42 082.05	4.90	46.98	45.18	14.60	7.16	33.06
BjuMAPK38	BjuOB02G35490	B02	64 340.45	8.95	37.60	40.85	11.01	6.22	41.92

(待续)

(续表 2)

Gene name	Gene ID	Chromosome	Molecular weight (Da)	Theoretical isoelectric point	Instability index	Alpha helix (%)	Extended strand (%)	Beta turn (%)	Random coil (%)
BjuMAPK39	BjuOB02G54720	B02	55 067.88	6.54	48.51	45.13	12.42	5.18	37.27
BjuMAPK40	BjuOB03G07290	B03	66 228.75	6.37	40.56	44.88	11.43	4.78	38.91
BjuMAPK41	BjuOB03G26460	B03	65 266.79	6.32	43.30	43.67	13.00	5.89	37.44
BjuMAPK42	BjuOB03G37620	B03	63 619.10	6.85	44.70	45.31	11.33	3.72	39.65
BjuMAPK43	BjuOB03G59970	B03	42 369.08	6.89	34.00	45.92	17.39	7.34	29.35
BjuMAPK44	BjuOB04G09420	B04	55 534.40	6.80	48.10	46.61	12.32	5.13	35.93
BjuMAPK45	BjuOB04G13890	B04	41 523.24	6.76	53.74	43.44	7.10	4.37	45.08
BjuMAPK46	BjuOB04G24430	B04	42 292.93	7.18	34.53	48.37	15.22	7.88	28.53
BjuMAPK47	BjuOB04G27900	B04	42 505.22	6.67	40.53	44.44	13.28	7.59	34.69
BjuMAPK48	BjuOB04G30740	B04	66 188.58	6.38	41.89	44.24	10.51	4.58	40.68
BjuMAPK49	BjuOB04G49310	B04	29 606.36	8.48	18.77	44.96	16.28	5.43	33.33
BjuMAPK50	BjuOB05G52720	B07	42 701.76	6.17	46.37	39.84	16.13	6.99	33.60
BjuMAPK51	BjuOB06G02920	B08	69 755.02	9.36	42.15	39.84	12.36	4.88	42.93
BjuMAPK52	BjuOB06G04940	B08	42 533.79	8.06	41.60	45.16	15.32	5.65	33.87
BjuMAPK53	BjuOB06G25860	B08	67 802.55	9.30	41.71	35.50	11.67	4.83	48.00
BjuMAPK54	BjuOB06G46240	B08	54 689.35	8.23	43.07	47.16	12.63	5.89	34.32
BjuMAPK55	BjuOB06G54540	B08	44 454.08	5.67	42.21	42.53	14.18	5.15	38.14
BjuMAPK56	BjuOB06G54690	B08	43 212.59	5.42	40.06	41.27	15.87	6.08	36.77
BjuMAPK57	BjuOB07G06380	B09	67 044.76	9.30	41.31	38.02	11.22	5.19	45.56
BjuMAPK58	BjuOB07G14580	B09	43 238.94	6.32	37.52	46.01	14.63	7.71	31.65
BjuMAPK59	BjuOB08G22730	B10	68 688.82	9.34	36.60	38.41	13.41	4.97	43.21
BjuMAPK60	BjuOB08G23470	B10	44 775.18	5.22	50.04	42.97	11.76	5.12	40.15
BjuMAPK61	BjuOB08G33870	B10	42 356.31	5.85	40.09	43.24	14.05	4.32	38.38
BjuMAPK62	BjuOB08G41430	B10	42 966.06	5.52	41.50	42.63	16.89	5.63	34.85
BjuMAPK63	BjuOB08G45950	B10	42 588.82	5.79	38.07	43.78	13.78	5.68	36.76
BjuMAPK64	BjuOB08G59650	B10	46 087.91	5.28	46.29	39.45	14.57	5.53	40.25
BjuMAPK65	BjuOB08G59660	B10	42 424.34	5.10	43.09	47.44	13.75	5.93	32.88
BjuMAPK66	BjuO_Contig00244G00410	Contig00244	45 363.89	5.28	49.83	42.07	12.34	6.30	39.29

对 66 个 BjuMAPK 基因的内含子-外显子结构进行了分析，如图 2 所示，a 组中除了 *BjuMAPK34* 含有 5 个外显子外，其余 6 个家族成员均有 6 个外显子；b 组成员中 *BjuMAPK23*、*BjuMAPK54* 分别含有 8 个和 7 个外显子，其余 19 个成员均含有 6 个外显子；c 组成员除了 *BjuMAPK25* 含有 4 个外显子之外，其余 7 个基因都只含有 2 个外显子；d 组成员的 30 个基因存在 6–11 个外显子。这表明不同亚家族之间的内含子/外显子差异较大，而同一亚家族内的成员之间具有相似的基因结构。

芥菜 MAPK 基因家族成员中共鉴定了 10 个保守基序，结果显示，motif2 与 motif7 存在于所有的 BjuMAPKs 蛋白序列中，且 motif7 中包括 TXY 特征基序，除 d 组的 BjuMAPK45 和 BjuMAPK49 蛋白外，a、b、c、d 组中的蛋白均具有 motif1、motif3、motif4 与 motif5 (图 2，图 3)。一些 motif 只存在于特定的亚群中，例如 motif6 只存在于 d 亚群。除 d 组成员，a、b、c 组成员在 C 端均具有激酶结构域(catalytic domain, CD)或被修饰的 CD 结构域(图 4)。

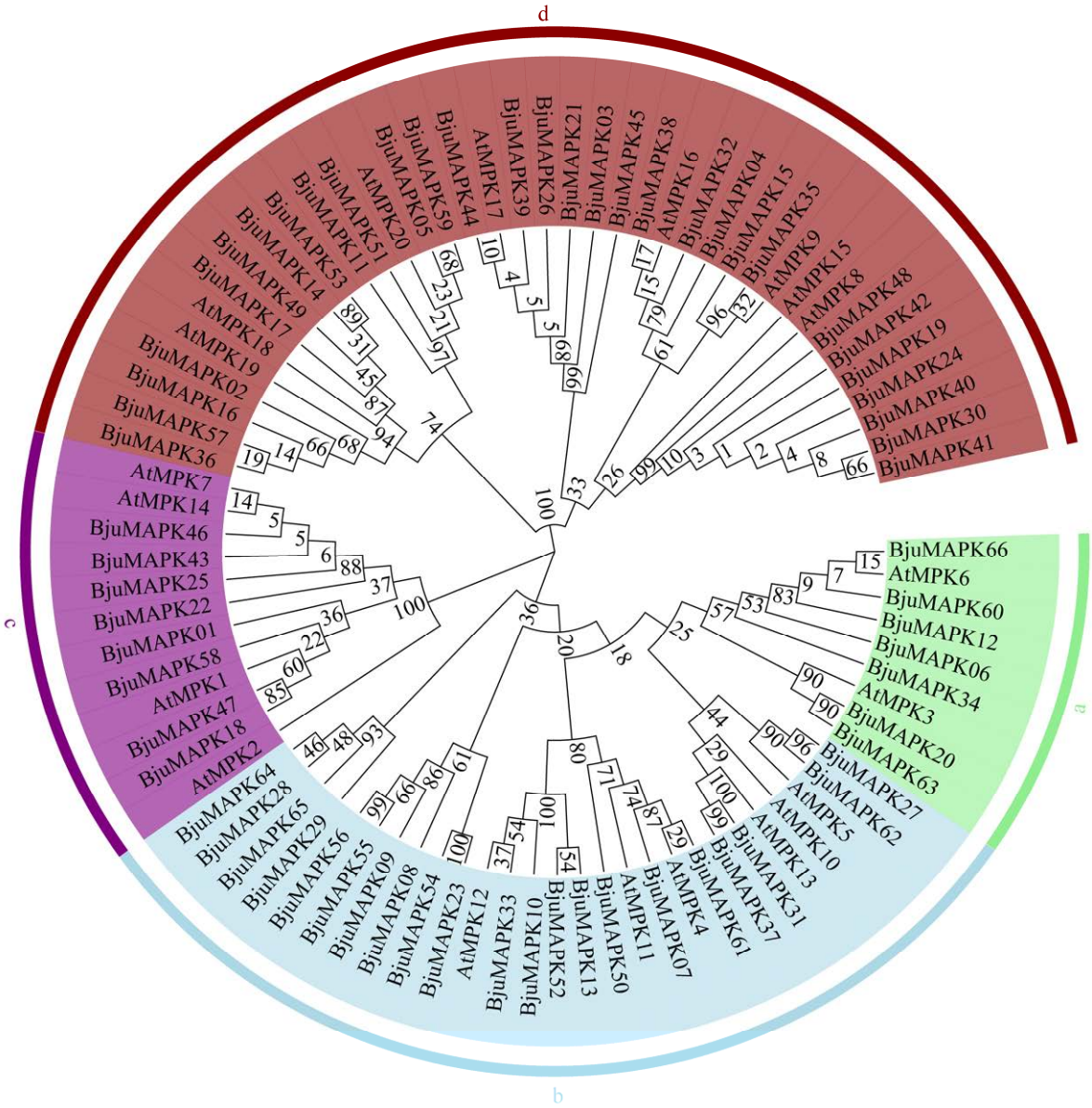

图 1　芥菜和拟南芥的 MAPK 基因家族系统发育进化树　Bju：芥菜；At：拟南芥。自展值：0–100。

Figure 1　Phylogenic tree of MAPK gene families in *Brassica juncea* and *Arobidopsis thaliana*. Bju: *Brassica juncea*; At: *Arobidopsis thaliana*. Bootstrap: 0–100.

2.4　基因染色体定位与启动子顺式作用元件分析

对芥菜的 MAPK 基因进行染色体定位分析。如图 5 所示，芥菜的 65 个 MAPK 基因不均匀地分布在 17 条染色体上，其中 A09 染色体与 B08 染色体含有的 MAPK 基因数目最多(各 7 个)，而 A02、A10 和 B07 染色体上分布的 MAPK 基因数目最少(各 1 个)，另外 1 个 MAPK 基因 *BjuMAPK66* 位于 Contig00244 上。此外，A04 染色体上包含串联重复基因 *BjuMAPK08* 和 *BjuMAPK09*，串联重复基因 *BjuMAPK64* 和 *BjuMAPK65* 分布在 B08 号染色体上。

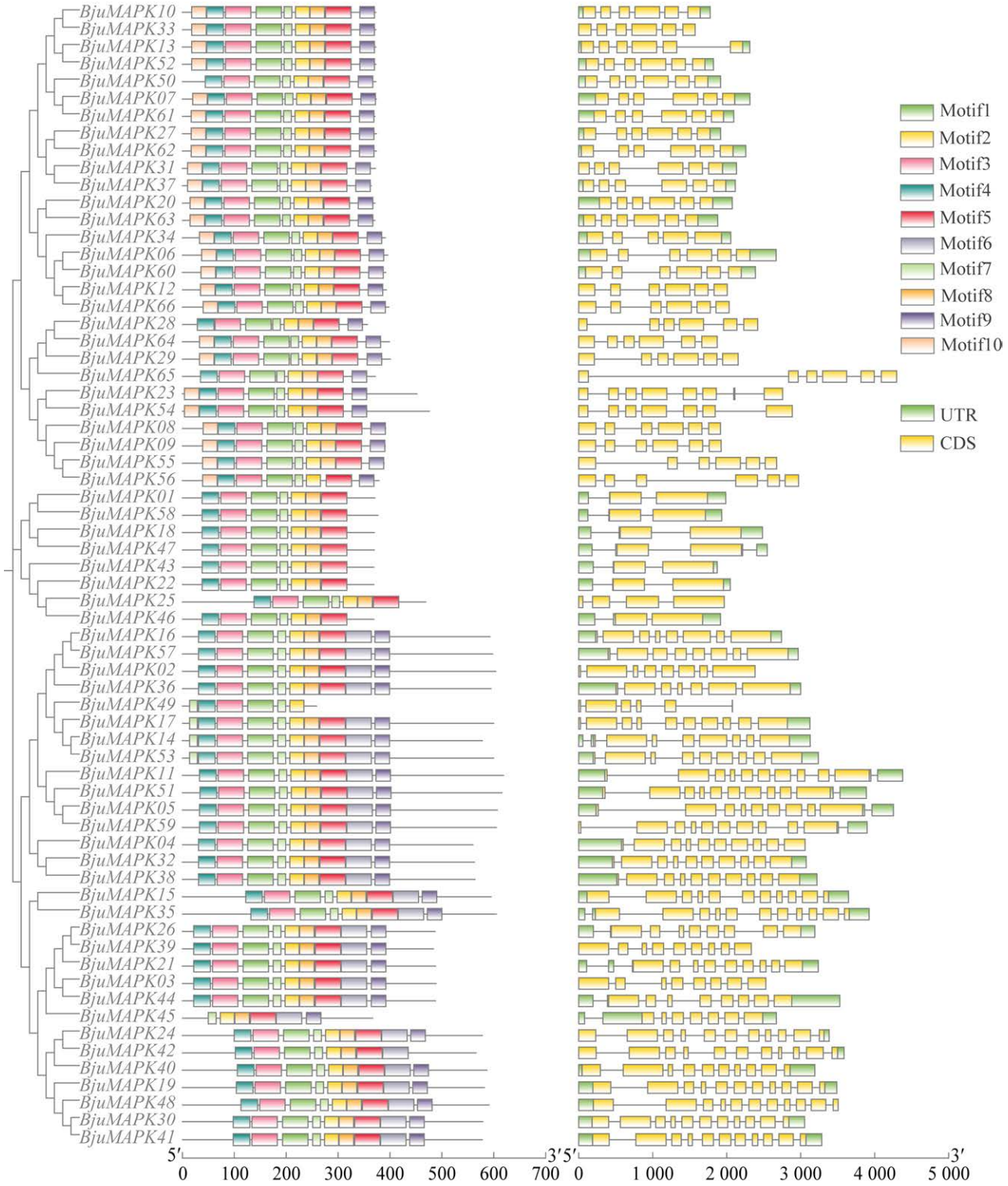

图 2 芥菜 BjuMAPK 家族成员保守基序和基因结构 Motif：保守基序；UTR：非翻译区；CDS：编码区序列。

Figure 2 Structure and conserved motifs of BjuMAPKs genes in *Brassica juncea*. Motif: Conserved base sequence; UTR: Untranslated region; CDS: Coding region sequence.

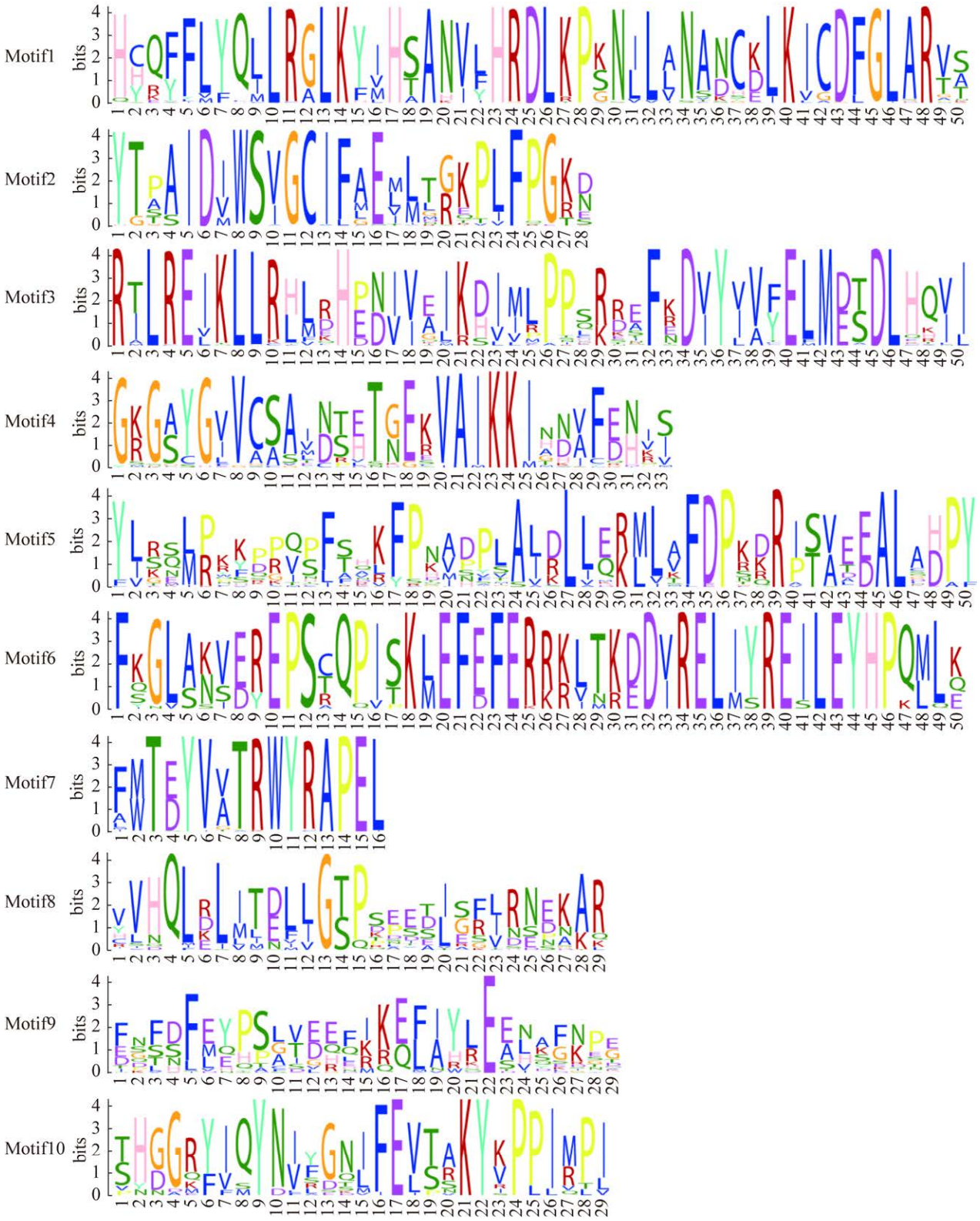

图 3　芥菜 MAPK 保守基序的序列标识　Motif：保守基序；不同字母代表不同的氨基酸。

Figure 3　Sequence Logo of the BjuMAPKs protein motifs in *Brassica juncea*. Motif: conserved base sequence; Different letters represent different amino acids.

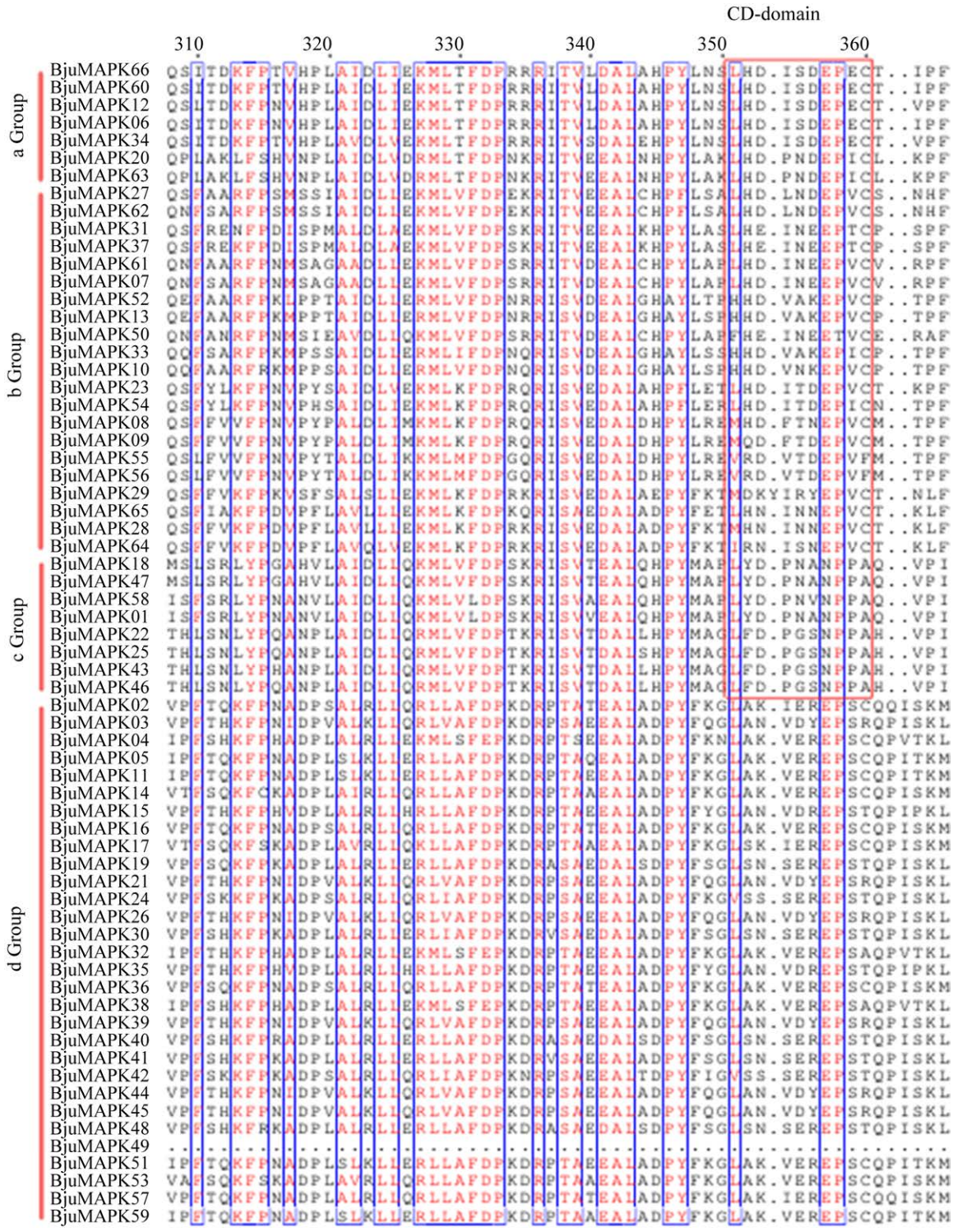

图 4　66 个 BjuMAPK 成员的部分氨基酸比对　红色框线内为 MAPK 保守结构域 CD-Domain，是 MAPKK、MAPK 磷酸酶和底物的对接位点。

Figure 4　Partial amino acid alignment of the 66 BjuMAPK members. The CD-Domain is the conserved domain of MAPK in the red frame, which is the docking site between MAPKK, MAPK phosphatase and substrates.

为了分析芥菜 MAPK 基因家族可能参与的生物学功能，对该家族基因的启动子序列进行分析。结果如图 6 所示，66 个 BjuMAPK 基因启动子区域共鉴定出 43 种 6 312 个顺式作用元件，除了含有常见的 CAAT-Box、TATA-Box 等基础保守元件外，还具有多种响应激素信号、低温、光照以及组织特异性表达等相关的顺式作用元件。其中 14、8、56 个 MAPK 基因分别含有响应生长素(auxin responsiveness)、赤霉素(gibberellin-responsiveness)、脱落酸(abscisic acid responsiveness)的调节元件。48、33 个 MAPK 基因分别含有响应茉莉酸甲酯(MeJA-responsiveness)、水杨酸(salicylic acid responsiveness)的调节元件，基因 *BjuMAPK24* 参与类黄酮(flavonoids biosynthetic genes regulation)生物合成。28、26、56 个 MAPK 基因分别含有响应干旱(MYB binding site involved in drought-inducibility)、低温(low-temperature responsiveness)和厌氧诱导(anaerobic induction)的调节元件。23 个 MAPK 基因含有参与防御和胁迫反应(defensive and stress responsiveness)的顺式作用元件。63 个 MAPK 基因含有光响应(light responsiveness)元件，这表明绝大部分芥菜 MAPK 基因可能受光的调节。9、22 个 MAPK 基因分别含有胚乳表达(endosperm expression)、分生组织表达(meristem expression)相关的顺式作用元件。以上结果表明 MAPK 基因可能在植物对激素、逆境胁迫的响应以及植物的生长发育中发挥重要作用。

2.5 实时荧光定量 PCR 分析

为探究根肿菌侵染芥菜幼苗后 BjuMAPK 的表达情况，对前期筛选的 18 个基因进行实时荧光定量 PCR 分析。结果如图 7 所示，接种根肿病的感病材料中 *BjuMAPK02*、*BjuMAPK17* 和 *BjuMAPK19* 这 3 个基因的表达量在侵染初期显著高于对照组，表明这些基因可能与芥菜对根肿菌的敏感性有关。它们的高表达可能会促进病菌

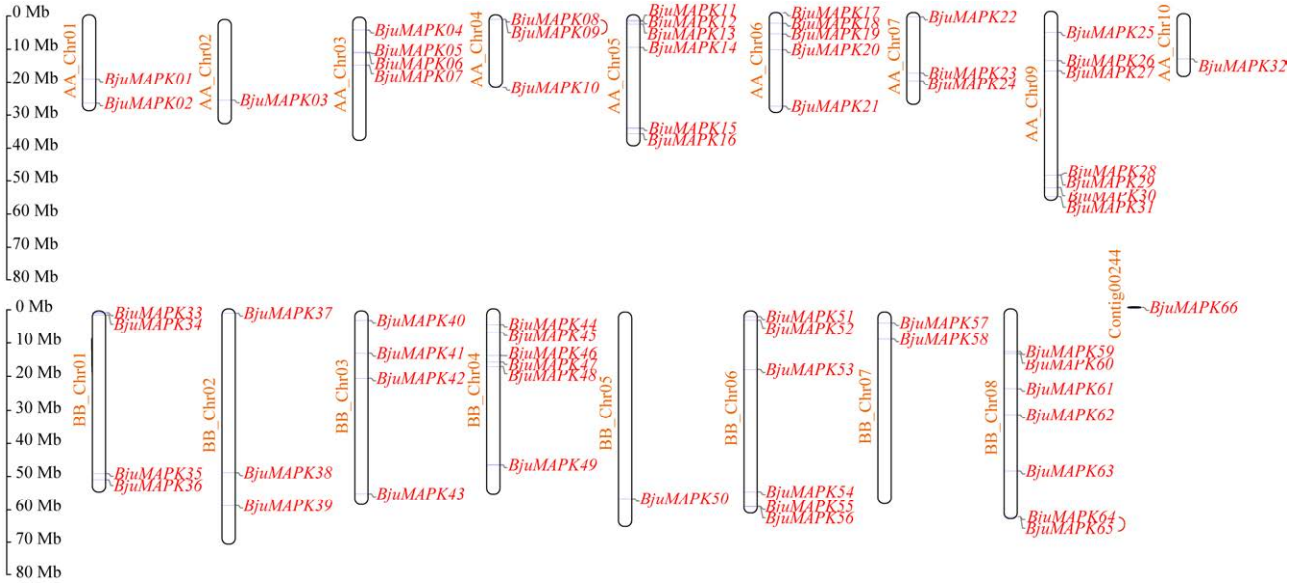

图 5 BjuMAPK 基因在芥菜染色体上的分布 黄色字体表示染色体名称；红色字体表示基因名称；红色半环连接的 2 个基因表示串联重复基因。

Figure 5 Localization of BjuMAPKs on chromosomes of *Brassica juncea*. Yellow fonts indicate chromosome names; Red fonts indicate the gene names; The two genes connected by the red semi-loop indicate tandem repeats.

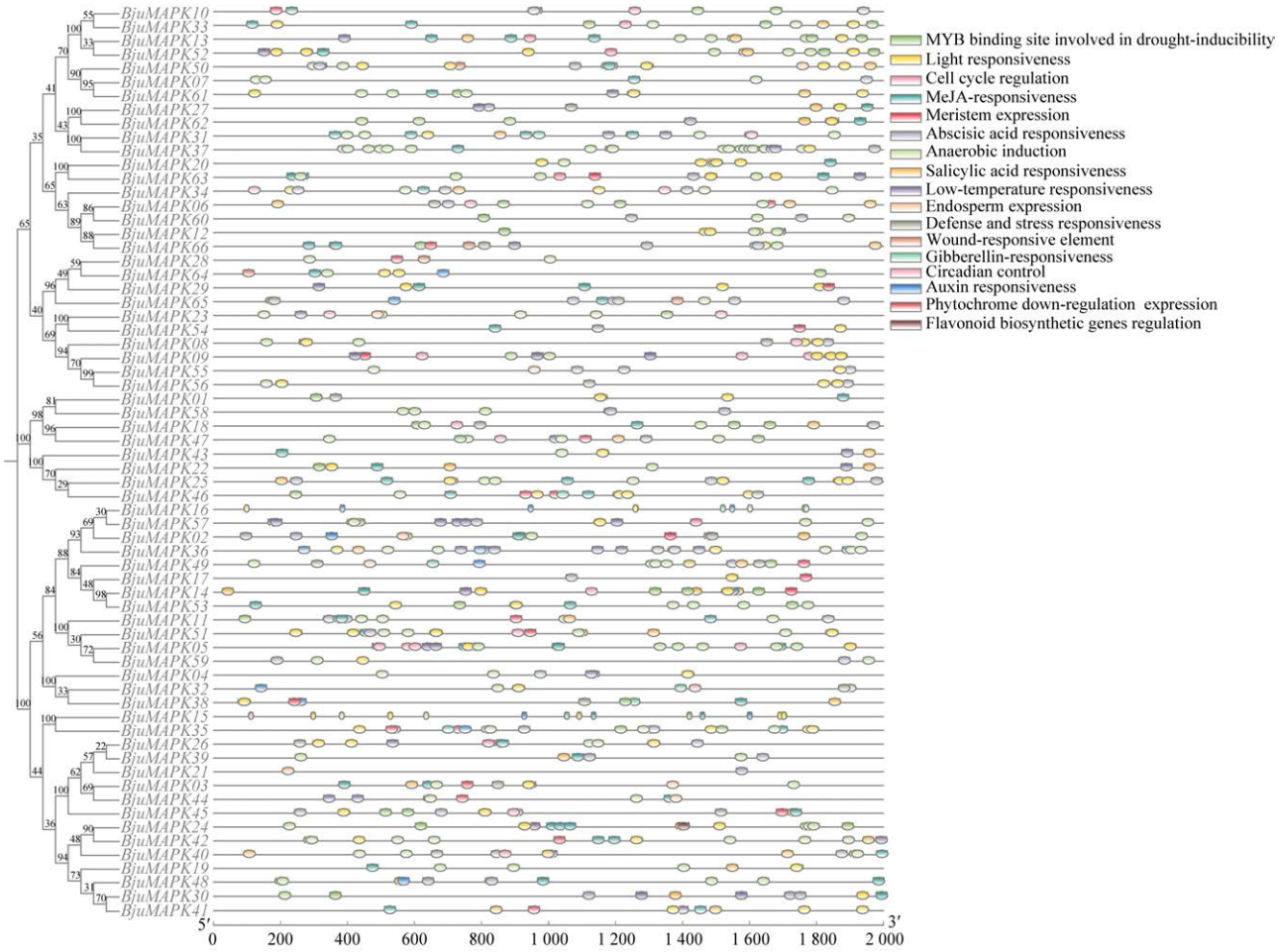

图 6 芥菜 66 个 BjuMAPK 基因启动子中的顺式作用元件 不同颜色表示具有不同功能的顺式作用元件。

Figure 6 Cis-acting elements in the promoter regions of 66 BjuMAPKs in *Brassica juncea*. Different colors represent cis-acting elements with different functions.

在植物体内的扩散和繁殖，从而加剧芥菜根肿病病害的发生。然而，这 3 个基因在抗病材料中的表达量显著下降，表明在抗病材料中，这些基因可能受到某些机制的抑制。这 3 个基因在不同材料中产生的差异表达模式为理解芥菜根肿菌的抗性机制提供了新的线索。无论是抗病材料还是感病材料，侵染初期 *BjuMAPK15* 在处理组中的表达量均显著低于对照组。*BjuMAPK30*、*BjuMAPK37*、*BjuMAPK38*、*BjuMAPK40*、*BjuMAPK48* 在抗病材料与感病材料的初侵染时期表达量达到最高峰，抗病材料与感病材料中 *BjuMAPK04* 的表达均呈现先增后降的趋势，在发病前期达到高峰。*BjuMAPK07*、*BjuMAPK32*、*BjuMAPK60* 在抗病材料与感病材料接种后的初侵染时期表达量下降，之后趋于稳定。*BjuMAPK30*、*BjuMAPK37*、*BjuMAPK38*、*BjuMAPK40*、*BjuMAPK48*、*BjuMAPK04*、*BjuMAPK07*、*BjuMAPK32*、*BjuMAPK60* 基因在处理组和对照组中的表达水平无明显差异，推测这 9 个基因未参与芥菜抗根肿菌的过程。其余基因在抗感材料的不同侵染时期均未检测到明显信号，推测这些基因在芥菜中不参与植物的基础免疫。

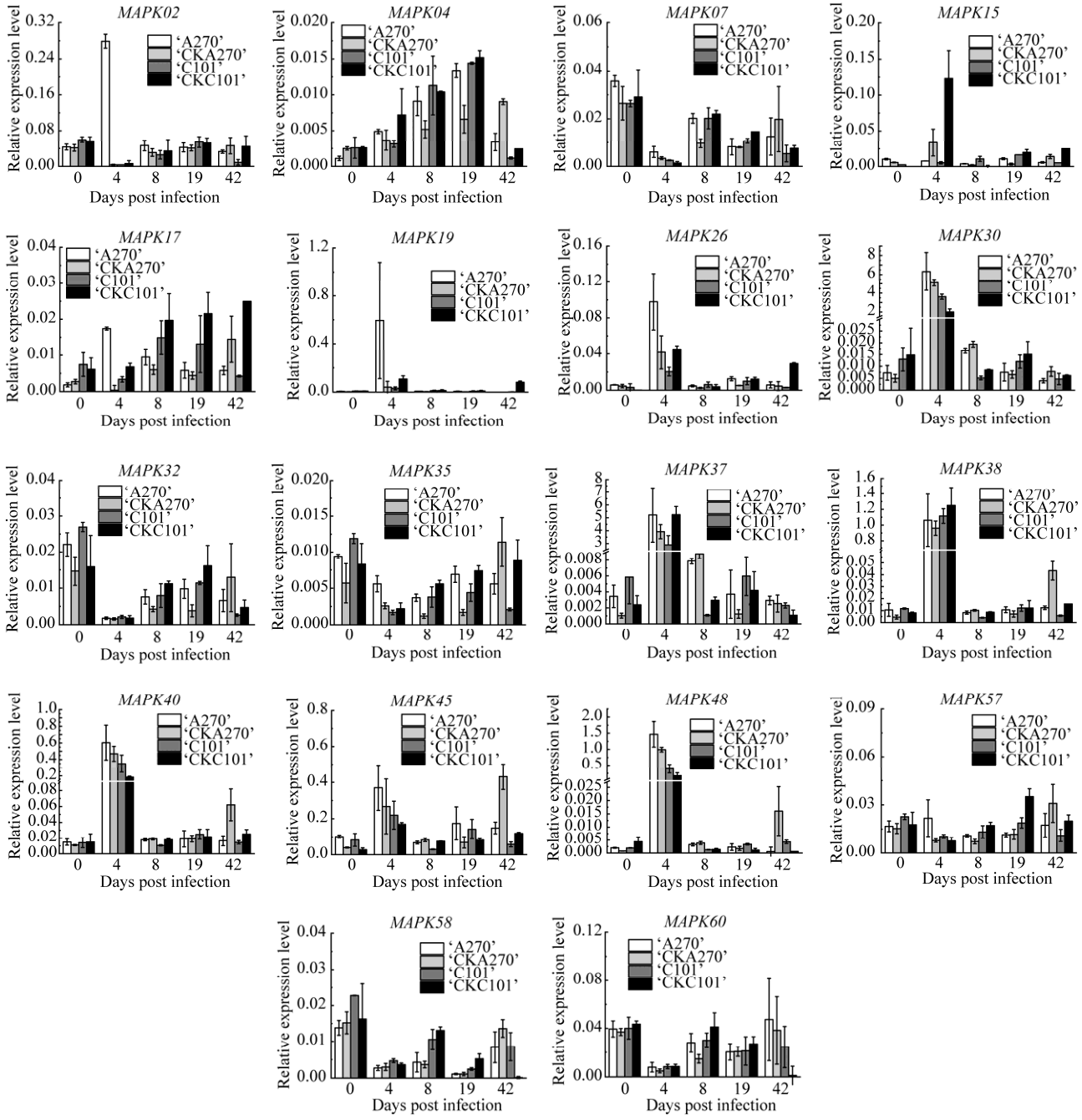

图 7　芥菜 BjuMAPK 基因在根肿菌侵染的芥菜根系中的表达分析　白色表示接种处理的感病材料‘A270’；浅灰表示未接种处理的感病材料‘A270’；深灰表示接种处理的抗病材料‘C101’；黑色表示未接种处理的抗病材料‘C101’。

Figure 7　Expression analysis of BjuMAPK genes in *Brassica juncea* root inoculated with *Plasmodiophora brassicae*. White represents inoculated susceptible material ‘A270’; Light grey represents uninoculated susceptible material ‘A270’; Dark grey represents inoculated resistant material ‘C101’; Black represents uninoculated resistant material ‘C101’.

3 讨论

芥菜在生长发育过程中易感染根肿病，严重影响芥菜的产量和品质。目前在油菜中已经发掘了与防御根肿病相关的 MAPK 基因，但尚未对芥菜的 MAPK 基因家族进行研究。基于此，本研究通过全基因组鉴定得到芥菜的 66 个 MAPK 基因家族成员，其中 65 个 BjuMAPKs 不均匀地分布在 17 条染色体上，在 A08 染色体上未发现 BjuMAPK 基因家族成员，这与甘蔗中的相关分析结果类似[34-35]。在 A04 和 B08 染色体上存在 2 对串联重复基因，推测串联重复事件可能在芥菜基因组的 MAPK 基因扩增中发挥重要作用。

通过多序列比对和构建系统发育进化树。根据保守的 TXY 三肽基序，将鉴定的 66 个 BjuMAPK 分为 a、b、c、d 这 4 个亚族。成员中除含有特征基序外，还含有非特征基序 TQY，这与文献报道一致[36]。Mohanta 等[37]通过分析 40 种植物的 589 个 MAPK 基因，发现新的活化环基序 MEY、TEM、TQM、TRM、TVY、TSY、TEC。与 a、b 和 c 组相比，d 组的 BjuMAPKs 的 t 环及 N 端区域具有 TDY 基序，这可能是其他激酶的靶磷酸化位点[38]。相比于 d 亚族，a、b、c 亚族的 C 端含有 CD 保守结构域，其保守序列为 LH(D/E)XX(D/E)PXC，是 MAPKKs 的停泊位点，该保守结构域在拟南芥和油菜中也有报道[11,39]。

BjuMAPKs 基因结构中外显子和内含子的数目与分布在同一亚族中具有相似性，a 组和 b 组中都包含 6 个外显子，c 组包含 2–4 个外显子，d 组含有的外显子数目较多，为 6–11 个。这样的基因结构模式在其他植物中也有所体现，表现为同一亚族内基因结构的保守性好，不同亚族间基因结构的变异程度高[36,40]。b 组成员和部分 a 组成员中不含有内含子，这种结构特征在云杉 MAPK 家族成员中也有体现[36]。BjuMAPK 基因的启动子区含有多种顺式作用元件，其中包含茉莉酸甲酯响应元件、光响应元件、低温和干旱响应元件、伤害响应元件、防御和胁迫反应响应元件等，这些元件的存在使得 BjuMAPK 基因能够响应各种环境刺激，从而调节植物的生长和环境适应能力。

有研究发现初侵染阶段是根肿菌与芥菜互作的关键时期[41]。本研究结果表明，无论是抗病材料还是感病材料，初侵染时期 *BjuMAPK15* 在处理组中的表达量均显著低于对照组。处理组感病材料 *BjuMAPK02*、*BjuMAPK17* 和 *BjuMAPK19* 的表达量在初侵染时期显著高于对照组，而这 3 个基因在抗病材料中的表达量呈下降趋势，推测这 3 个基因在芥菜的抗病反应中起负调控作用。BjuMAPK 在芥菜响应根肿病胁迫反应中的作用仍需进一步研究。

4 结论

本研究利用生物信息学技术分析鉴定了 66 个芥菜 MAPK 基因，分为 a、b、c、d 四个亚族，同一亚族成员含有相似的保守基序和基因结构，顺式作用元件分析显示 BjuMAPK 基因参与植物对激素、逆境胁迫的响应以及植物的生长发育，通过 qRT-PCR 初步鉴定响应根肿病的 MAPK 基因，*BjuMAPK02*、*BjuMAPK15*、*BjuMAPK17* 和 *BjuMAPK19* 在根肿菌侵染芥菜后具有不同的响应模式，本研究为进一步研究 BjuMAPK 基因在芥菜应对根肿病生物胁迫中的功能奠定了理论基础。

REFERENCES

[1] CHAI AL, XIE XW, SHI YX, LI BJ. Research status of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on cruciferous

crops in China[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2014, 36(sup1): 142-153.
[2] TIAN XL, WANG DD, MAO ZC, PAN LM, LIAO JJ, CAI ZM. Infection of *Plasmodiophora brassicae* changes the fungal endophyte community of tumourous stem mustard roots as revealed by high-throughput sequencing and culture-dependent methods[J]. PLoS One, 2019, 14(6): e0214975.
[3] MALINOWSKI R, SMITH JA, FLEMING AJ, SCHOLES JD, ROLFE SA. Gall formation in clubroot-infected *Arabidopsis* results from an increase in existing meristematic activities of the host but is not essential for the completion of the pathogen life cycle[J]. The Plant Journal, 2012, 71(2): 226-238.
[4] CAVALIER-SMITH T, CHAO EEY. Phylogeny and classification of Phylum cercozoa (*Protozoa*)[J]. Protist, 2003, 154(3/4): 341-358.
[5] DONALD C, PORTER I. Integrated control of clubroot[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2009, 28(3): 289-303.
[6] WALLENHAMMAR AC. Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels[J]. Plant Pathology, 1996, 45(4): 710-719.
[7] 罗远莉. 根肿病菌侵染茎瘤芥差减文库的构建及其差异表达基因鉴定[D]. 重庆: 重庆大学, 2014.
LUO YL. Construction of subtractive library of stem mustard infected by *Rhizoctonia solani* and identification of its differentially expressed genes [D]. Chongqing: Chongqing University, 2014 (in Chinese).
[8] 王金龙. 芸苔属抗根肿病抗病位点鉴定与挖掘[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
WANG JL. Identification and excavation of resistance sites to clubroot in Brassica[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022 (in Chinese).
[9] PITZSCHKE A, SCHIKORA A, HIRT H. MAPK cascade signalling networks in plant defence[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12(4): 421-426.
[10] BARTELS S, ANDERSON JC, GONZÁLEZ BESTEIRO MA, CARRERI A, HIRT H, BUCHALA A, MÉTRAUX JP, PECK SC, ULM R. MAP kinase phosphatase1 and protein tyrosine phosphatase1 are repressors of salicylic acid synthesis and SNC1-mediated responses in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2009, 21(9): 2884-2897.
[11] KAZUYA ICHIMURA ET AL MG, ICHIMURA K, SHINOZAKI K, TENA G, SHEEN J, HENRY Y, CHAMPION A, KREIS M, ZHANG SQ, HIRT H, WILSON C, HEBERLE-BORS E, ELLIS BE, MORRIS PC, INNES RW, ECKER JR, SCHEEL D, KLESSIG DF, MACHIDA Y, MUNDY J, OHASHI Y, WALKER JC. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature[J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(7): 301-308.
[12] RODRIGUEZ MCS, PETERSEN M, MUNDY J. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61: 621-649.
[13] 李悦鹏, 张晓兰, 于雷, 耿国明, 齐红岩. MAPK 级联途径激酶结构特点及其信号转导途径在园艺作物逆境中的作用[J]. 植物生理学报, 2018, 54(8): 1305-1315.
LI YP, ZHANG XL, YU L, GENG GM, QI HY. Structural characteristics of MAPK cascade kinase and the function of signal transduction pathway in adversity stress of horticultural crop[J]. China Industrial Economics, 2018, 54(8): 1305-1315 (in Chinese).
[14] CHEN J, WANG LH, YANG ZY, LIU HB, CHU CL, ZHANG ZZ, ZHANG QL, LI XH, XIAO JH, WANG SP, YUAN M. The rice Raf-like MAPKKK OsILA1 confers broad-spectrum resistance to bacterial blight by suppressing the OsMAPKK4-OsMAPK6 cascade[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2021, 63(10): 1815-1842.
[15] ZHANG MM, SU JB, ZHANG Y, XU J, ZHANG SQ. Conveying endogenous and exogenous signals: MAPK cascades in plant growth and defense[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2018, 45(Pt A): 1-10.
[16] CHANG L, KARIN M. Mammalian MAP kinase signalling cascades[J]. Nature, 2001, 410(6824): 37-40.
[17] HAMEL LP, NICOLE MC, SRITUBTIM S, MORENCY MJ, ELLIS M, EHLTING J, BEAUDOIN N, BARBAZUK B, KLESSIG D, LEE J, MARTIN G, MUNDY J, OHASHI Y, SCHEEL D, SHEEN J, XING T, ZHANG SQ, SEGUIN A, ELLIS BE. Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and *MAPKK* gene families[J]. Trends in Plant Science, 2006, 11(4): 192-198.
[18] JONAK C, ÖKRÉSZ L, BÖGRE L, HIRT H. Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002, 5(5): 415-424.
[19] ASAI T, TENA G, PLOTNIKOVA J, WILLMANN MR, CHIU WL, GOMEZ-GOMEZ L, BOLLER T, AUSUBEL FM, SHEEN J. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity[J]. Nature, 2002, 415(6875): 977-983.
[20] DÓCZI 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[J]. The Plant Cell, 2007, 19(10): 3266-3279.
[21] GAO MH, LIU JM, BI DL, ZHANG ZB, CHENG F, CHEN SF, ZHANG YL. MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants[J]. Cell Research, 2008, 18(12): 1190-1198.
[22] MENG XZ, XU J, HE YX, YANG KY, MORDORSKI B, LIU YD, ZHANG SQ. Phosphorylation of an ERF transcription factor by *Arabidopsis* MPK3/MPK6 regulates plant defense gene induction and fungal resistance[J]. The Plant Cell, 2013, 25(3): 1126-1142.
[23] LIU YD, REN DT, PIKE S, PALLARDY S, GASSMANN W, ZHANG SQ. Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade[J]. The Plant Journal, 2007, 51(6): 941-954.
[24] REN DT, LIU YD, YANG KY, HAN L, MAO GH, GLAZEBROOK J, ZHANG SQ. A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008,

105(14): 5638-5643.
[25] HE C, FONG SH, YANG D, WANG GL. BWMK1, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1999, 12(12): 1064-1073.
[26] XIONG LZ, YANG YN. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase[J]. The Plant Cell, 2003, 15(3): 745-759.
[27] ROHILA JS, YANG YN. Rice mitogen-activated protein kinase gene family and its role in biotic and abiotic stress response[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2007, 49(6): 751-759.
[28] MELECH-BONFIL S, SESSA G. Tomato MAPKKKε is a positive regulator of cell-death signaling networks associated with plant immunity[J]. The Plant Journal, 2010, 64(3): 379-391.
[29] MUNNIK T, LIGTERINK W, CALDERINI O, BEYERLY J, MUSGRAVE A, HIRT H. Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress[J]. The Plant Journal, 1999, 20(4): 381-388.
[30] HOYOS ME, ZHANG S. Calcium-independent activation of salicylic acid-induced protein kinase and a 40-kilodalton protein kinase by hyperosmotic stress[J]. Plant Physiology, 2000, 122(4): 1355-1363.
[31] PIAO YL, JIN KN, HE Y, LIU JX, LIU S, LI XN, PIAO ZY. Genome-wide identification and role of MKK and *MPK* gene families in clubroot resistance of *Brassica rapa*[J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0191015.
[32] 吴道军. 十字花科根肿病室内接种标准化研究[D]. 重庆: 西南大学, 2013.
WU DJ. Study on standardization of indoor inoculation of clubroot in Cruciferae[D]. Chongqing: Southwest University, 2013 (in Chinese).
[33] BHARDWAJ AR, JOSHI G, KUKREJA B, MALIK V, ARORA P, PANDEY R, SHUKLA RN, BANKAR KG, KATIYAR-AGARWAL S, GOEL S, JAGANNATH A, KUMAR A, AGARWAL M. Global insights into high temperature and drought stress regulated genes by RNA-Seq in economically important oilseed crop *Brassica juncea*[J]. BMC Plant Biology, 2015, 15: 9.
[34] ALI A, CHU N, MA PP, JAVED T, ZAHEER U, HUANG MT, FU HY, GAO SJ. Genome-wide analysis of mitogen-activated protein (MAP) kinase gene family expression in response to biotic and abiotic stresses in sugarcane[J]. Physiologia Plantarum, 2021, 171(1): 86-107.
[35] ZHANG XY, XU XY, YU YJ, CHEN C, WANG J, CAI CP, GUO WZ. Integration analysis of MKK and MAPK family members highlights potential MAPK signaling modules in cotton[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 29781.
[36] MOHANTA TK, ARORA PK, MOHANTA N, PARIDA P, BAE HH. Identification of new members of the MAPK gene family in plants shows diverse conserved domains and novel activation loop variants[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 58.
[37] MOHANTA TK, MOHANTA N, PARIDA P, PANDA SK, PONPANDIAN LN, BAE HH. Genome-wide identification of mitogen-activated protein kinase gene family across fungal lineage shows presence of novel and diverse activation loop motifs[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0149861.
[38] WANG M, CHEN JX, ZHU XW, TAI X, BO TY. In silico analysis of the MAPK gene family in cabbage and its expression during development and stress response[J]. Horticulturae, 2023, 9(10): 1119.
[39] LIANG WW, YANG B, YU BJ, ZHOU ZL, LI C, JIA M, SUN Y, ZHANG Y, WU FF, ZHANG HF, WANG BY, DEYHOLOS MK, JIANG YQ. Identification and analysis of MKK and MPK gene families in canola (*Brassica napus* L.)[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 392.
[40] WANG Z, WAN YY, MENG XJ, ZHANG XL, YAO MN, MIU WJ, ZHU DM, YUAN DS, LU K, LI JN, QU CM, LIANG Y. Genome-wide identification and analysis of MKK and MAPK gene families in *Brassica* species and response to stress in *Brassica napus*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(2): 544.
[41] CAI ZM, XIANG MQ, TAN J, CHENG CH, LIU Y, SHI JY, SHI ML, LI J, WANG DD. High-throughput sequencing reveals tuber mustard genes responsive to *Plasmodiophora brassicae* in the early stage of infection[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2023, 123: 101943.