

研究报告

A Letter

陆地棉 *GhSUMO* 基因的克隆与黄萎病菌诱导表达分析

赵付安^{1,2} 房卫平^{1*} 杨晓杰¹ 谢德意¹ 李武¹ 吕淑萍¹

¹ 河南省农业科学院经济作物研究所, 郑州, 4500021; ² 河南大学生命科学学院, 开封, 475100

* 通讯作者, Fangweiping@371.net

摘 要 SUMO 化修饰与植物抗病防御、信号转导和耐旱等有着直接的关系。本文以抑制差减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术获得 SUMO 的 EST 为信息探针,对棉花 EST 数据库进行同源搜索和电子克隆,获得了全长为 396 bp 的 *SUMO* 基因编码区 cDNA 全长,我们将该基因命名为 *GhSUMO*,推测该基因编码 95 个氨基酸。分别以抗黄萎病陆地棉品种豫棉 21 号的 cDNA 和 DNA 为模板,对该基因进行了 PCR 扩增验证,测序结果表明 *GhSUMO* 基因序列与电子克隆序列一致,且没有内含子。蛋白序列分析表明,该蛋白具有保守泛素结构域和 C 端双 Gly 的断裂/连接位点,以及保守的疏水表面和 Ulp1-Smt3 互作位点。系统进化分析表明,该蛋白与蓖麻的同源序列表现了最高的相似性,与其它双子叶植物同源序列次之,而与单子叶植物的相似性较低。棉苗接菌后实时定量 PCR 结果显示,该基因表达量在接黄萎病菌的量 48 h 后明显上调,96 h 达到未接菌对照的 5 倍以上。*GhSUMO* 基因可受黄萎病菌诱导表达,表明该基因在陆地棉抗黄萎病的机制中可能发挥重要作用。

关键词 陆地棉, *GhSUMO* 基因, 电子克隆, 诱导表达, 定量 PCR

Cloning and Expression Analysis of *GhSUMO* Gene from Upland Cotton Inoculated with *Verticillium dahliae* Kleb

Zhao Fu'an^{1,2} Fang Weiping^{1*} Yang Xiaojie¹ Xie Deyi¹ Li Wu¹ Lv Shuping¹

¹ Institute of Cash Crops Research, Henan Academy of Agricultural Science, Zhengzhou, 450002; ² College of Life Science, Henan University, Kaifeng, 475100

* Corresponding author, Fangweiping@371.net

DOI: 10.3969/gab.030.000359

Abstract As an important post-translational modification, sumoylation SUMO participates in a number of biological processes, including plant disease resistance, signal transduction and drought tolerance et al. Using an EST of a small ubiquitin-related modifier gene as the query probe to blast cotton EST database, a *SUMO* gene, with a complete open reading fragment (ORF) 396 bp encoding a protein of 95 amino acids, was successfully obtained *in silico* cloning and was named *GhSUMO*. The *GhSUMO* gene was verified by PCR amplifications using the cDNA and DNA templates from the root of upland cotton Yumian 21, which was of resistance to *Verticillium* wilt, and sequencing results showed that the *GhSUMO* had no intron. Sequence analysis showed that the protein has a conserved ubiquitin domain, the C-terminal double Gly fracture/Connection site, a conservative hydrophobic surface and an Ulp1-Smt3 interaction sites. Phylogenetic analysis showed the *GhSUMO* was highly identical with its ortholog from *Ricinus communis*, and the next most similar orthologs coming from other dicotyledons, but far away from monocotyledons. Quantitative PCR analysis showed that *GhSUMO* expression was significantly upregulated at the 48 h past inoculation with *Verticillium dahliae*, and the fold of relative gene expression at 96 h reached, more than 5 times. The induced expression of *GhSUMO* suggested that the gene may play important roles in the mechanism of resistance to *Verticillium* wilt of upland cotton.

Keywords Upland cotton, *GhSUMO* gene, *In silico* cloning, Induced expression, Real-time PCR

棉花黄萎病(*Verticillium wilt*)是一种土传病害,特点是分布广、危害重,是目前全球危害棉花的第一病害。我国是世界上的产棉大国,棉花生产对国民经济的发展具有重要影响,而我国棉花生产一直受枯、黄萎病的制约,尤其是黄萎病对棉花生产的影响最为严重。因此如何防治棉花黄萎病成为我国棉花生产上亟待解决的一个问题。利用抗病品种无疑是一种最经济、有效和环保的措施,而培育抗病品种需要明确抗病机制和寻找高抗黄萎病的基因。在棉花抗病育种方面,世界上许多国家都在积极实践。目前,由于棉花的 *R* 基因(resistance gene)尚未克隆(涂礼莉等, 2003),用于棉花抗病转基因研究的只有 *D* 基因(defence gene) (Gao et al., 2006),主要包与植保素合成有关的基因、病程相关(pathogenesis-related, *PR*)蛋白基因和与结构抗性有关的基因等,最常见是几丁质酶(*Chitinase*, *CHT*) (程红梅等, 2005)和 β -1,3-葡聚糖酶(β -1,3-glucanase, *GLU*)基因(吴家和等, 2004)。

小分子泛素样修饰肽(small ubiquitin-related modifier, SUMO)是一类普遍存在于真核生物中蛋白质家族,在结构上与泛素相似且十分保守。翻译后的 SUMO 化修饰是蛋白质发挥生物学功能的一种重要调节机制,广泛参与胞内多种代谢途径,在核质运输、离子通道、信号转导、DNA 损伤修复、转录及细胞周期调控和生物节律等很多方面均发挥着十分重要的作用(陈泉和施蕴渝, 2004)。目前,有关植物 SUMO 化修饰在生物学功能方面的研究仍处于起步阶段。Hanania 等(1999)在番茄上首次发现,真菌木聚糖酶和番茄 SUMO 相互连接,能够迅速诱导番茄产生防御反应,并且转基因番茄中 SUMO 的表达能有效抑制 EIX 诱导的防御反应。

本研究以前期构建的黄萎病菌诱导下抗病陆地棉豫棉 21 号 SSH 文库中,上调表达 SUMO 基因的 EST 为信息探针,利用电子克隆的方法, Blast 检索 GenBank 中的棉花 EST 数据库,拼接同源的 EST 序列,获得了陆地棉 SUMO 基因的编码区 cDNA 全长序列,通过 PCR 手段验证其真实性,并利用生物信息学的方法对该 cDNA 序列进行了分析。利用实时定量 PCR 法研究了豫棉 21 号在黄萎病菌接种不同时间该基因的表达情况。为进一步利用该基因研究棉花抗病机理和改良棉花的黄萎病抗性奠定了基础。

1 结果与分析

1.1 陆地棉 *GhSUMO* 编码区 cDNA 序列的电子克隆

以抑制差减杂交(SSH)技术获得的一条差异表

达 EST 为信息探针,对棉花 EST 数据库进行同源搜索和序列拼接,获得的两条 EST 序列(DW505475 和 TA22328_3635)作为组装拼接的候选 EST,其与信息探针的相似性程度均为 100%。用在线分析工具 CAP EST Assembler 程序将上述 2 条候选 EST 序列进行 Contig 拼接,结果显示能够形成一个完整的长为 396 bp 的 Contig。通过 NCBI 在线分析工具 ORF finder 服务器对所拼接的 cDNA 序列进行开放读码框架搜索,发现其具有完整的编码区开放阅读框。拼接结果和电子克隆序列见图 1。

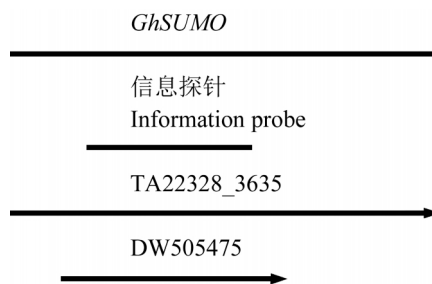


图 1 豫棉 21 号 *GhSUMO* 基因编码区 cDNA 序列拼接示意图
Figure 1 Diagram of *GhSUMO* of Yumian 21 encoding region cDNA assembly

1.2 棉花基因组 DNA 和总 RNA 提取及 *GhSUMO* 基因编码区全长 cDNA 的获得

提取豫棉 21 号基因组 DNA,紫外分光光度计测定基因组 DNA 的 $OD_{260/280}$ 值为 1.87,表明纯度较高;琼脂糖凝胶电泳结果同样表明(图 2),基因组 DNA 无降解,完整性较好。以上表明提取的基因组 DNA 可以用于扩增 SUMO 全长基因的 PCR 模板。分别提取接种黄萎病菌以及未接种黄萎病菌的豫棉 21 号总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 的 OD_{260} 和 OD_{280} 值分别为 2.01 和 1.99,表明总 RNA 纯度很好,电泳结果也表明 28S/18S 约等于 2,可以用于 cDNA 第一链的合成等后续实验(图 3)。

利用非翻译区序列设计的 *GhSUMO*F 和 *GhSUMO*R 引物组合,分别对豫棉 21 基因组 DNA 和 cDNA 进行扩增,所得片段长度一致,均为 437 bp 左右(图 4)。回收、克隆测序结果和推导的氨基酸序列见下图 5。

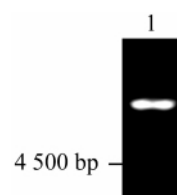


图 2 豫棉 21 号基因组 DNA 电泳检测
Figure 2 Gel electrophoresis of Yumian 21 genomic DNA

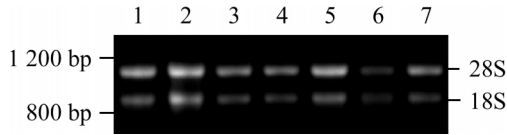


图3 豫棉 21 总 RNA 电泳检测

注: 1~7: 接菌后取材时间(h)

Figure 3 Gel electrophoresis of total RNA of cotton (Yumian 21)

Note: 1~7: The time collecting material after inoculation (h)

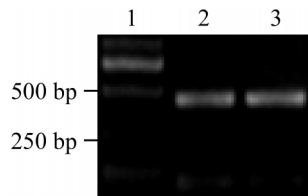


图4 PCR 产物凝胶电泳检测

注: 1: DNA 分子量标准 DL2000; 2: 基因组 DNA 扩增产物; 3: cDNA 扩增产物

Figure 4 Gel electrophoresis of PCR products

Note: 1: DNA molecular weight standard Marker DL2000; 2: PCR product from genomic DNA; 3: PCR product from cDNA

```

1  AGTACGAGTCCATGCTCCGGCCGCCATGGCGCGCGGAATTGATTAAATCGCCGAGG
61  AAAACAACATGTCGGGCGCAGCAAGAAGATAAGAAACCGCGATCAGTCCGCCGCTC
    M S G Q Q E E D K K P G D Q S A A
121 ACATCAACCTCAAAGTCAAAGGCCAGGACGGGAATGAAGTTTCTTCAGGATCAAAGAA
    H I N L K V K G Q D G N E V F F R I K R
181 GCACACAATTGAAGAAGCTCATGATGCATATTGCGACCGACAATCTGTGATTTCAACT
    S T Q L K K L M N A Y C D R Q S V D F N
241 CGATTGCTTCTTGTTCGATGTCGCGCTGCGAGGTGAGCAAACTCCGGACGAACTTG
    S I A F L F D G R R L R G E Q T P D E L
301 AGATGGAGGATGGTGTAGATGAGTGTGCTATGCTTACCAAACCGGTGGTACTGTGTA
    E M E D G D E I G A M L H Q T G G T V *
361 GCGAGTACTACTTTGCGCAITTAGTATTGATGAGTTAGTTATGTTCTGATTATGTAAG
    
```

图5 豫棉 21 *GhSUMO* 基因的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列
注: □: 起始密码子和终止密码子

Figure 5 The cDNA sequences and deduced amino acid sequences of *GhSUMO* from upland cotton (Yumian 21)

Note: □: Start codon and stop codon

1.3 开放阅读框分析

通过 NCBI 上的在线分析工具 ORF finder 服务对所得到的 cDNA 序列进行开放读码框架分析, 发现其开放阅读框位于第 69~297 位, 推测编码 95 个氨基酸(图 5)。在 cDNA 5' 端第 69 碱基位点为起始密码子 ATG; 第 298 碱基处的 3' 端为终止密码子 TGA。将推导的蛋白质氨基酸序列输入 GOR secondary structure prediction 蛋白质二级结构模型预测软件分析结果见图 6。该蛋白的二级结构, 是由分布在整个蛋白内许多 α -螺旋结构、大量的无规则卷曲和扩展链结构组成, 其中 α -螺旋结构占 42.5%, 而扩展链和无规则卷曲各占 3.75% 和 53.75%。

根据 NCBI Specialized Blast 中在线分析工具

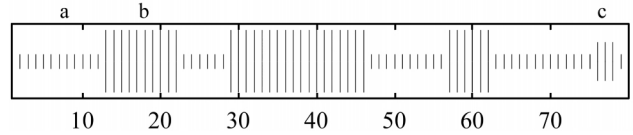


图6 豫棉 21 *GhSUMO* 基因编码蛋白二级结构预测

注: a: 无规则卷曲; b: α -螺旋; c: 扩展链

Figure 6 Secondary structure prediction of the encoded protein of *GhSUMO* from upland cotton (Yumian 21)

Note: a: Random coli; b: Alpha helix; c: Extended strand

Conserved Domains 进行蛋白质保守域预测和分析发现该推测蛋白保守的疏水表面结构域和 Ulp1-Smt3 互作位点保守域, 序列比对结果表明, 所有的 SUMO 蛋白都具有保守的泛素结构域和 C 端双 Gly 的断裂/连接位点(图 5; 图 7)。

1.4 不同物种间 SUMO 蛋白氨基酸序列多重比对及进化树分析

对推测的陆地棉 SUMO 蛋白的氨基酸序列与 NCBI 数据库中的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, CAA-67923.1)、烟草(*Nicotiana benthamiana*, ACJ54186.1)、蓖麻(*Ricinus communis*, XP_002529470.1)、葡萄(*Vitis vinifera*, XP_002274949.1)、水稻(*Oryza sativa*, NP_001045207.1)、玉米(*Zea mays*, NP_001148325.1)和高粱(*Sorghum bicolor*, XP_002458989.1)的氨基酸序列同源性分析显示, 棉花与上述序列进行比对, 相似性分别为 83.2%、86.3%、90.5%、85.1%、83.2% 和 86.3%, 表明该基因在氨基酸水平上有着很高的相似性。利用 DNAMAN 软件, 采用近邻法构建进化树表明, 首先棉花 *GhSUMO* 基因与蓖麻聚在一起, 其同源性也最高, 而后与葡萄聚在一起。虽然双子叶植物和单子叶植物各聚为一个分支, 两个分支物种的同源性同样很高。该现象说明该蛋白是自然界中是高度保守的(图 8)。

1.5 陆地棉 SUMO 基因表达谱分析

采用天恩泽基因公司的 Column Plant RNAout Kit 提取接菌和未接菌棉花根的总 RNA, 并对 RNA 的浓度及完整性进行检测, 结果表明 RNA 的完整性和浓度均符合定量 PCR 实验要求(图 9)。以组成型表

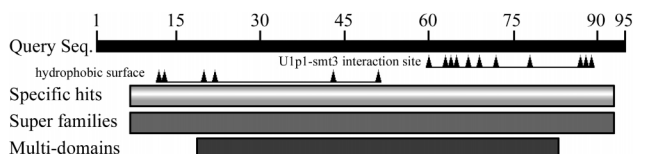


图7 豫棉 21 *GhSUMO* 基因编码蛋白保守域分析

Figure 7 Conserved domain analysis of *GhSUMO* from upland cotton (Yumian 21)

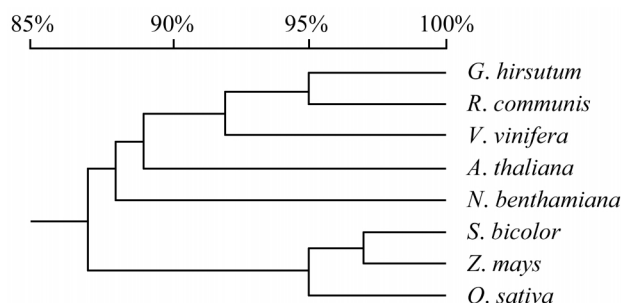


图8 豫棉21 *GhSUMO* 基因推导的氨基酸序列与其它植物氨基酸序列系统发育树

Figure 8 Phylogenetic tree of a amino acid sequence of *SUMO* genes in upland cotton (Yumian 21) with other species

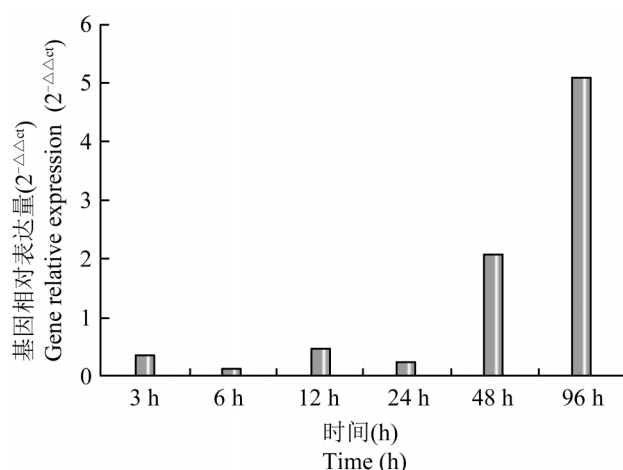


图9 豫棉21 *GhSUMO* 基因的表达谱分析

注: 横坐标为接菌后取样时间(h), 纵坐标为基因相对表达量($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Figure 9 Expression analysis of *GhSUMO* gene of upland cotton (Yumian 21)

Note: Abscissa represents times past of inoculation with *Verticillium dahliae* (hours); Ordinate represents gene relative expression ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

达内源基因 18S rRNA 为内参基因,以未接菌豫棉21号为对照进行定量分析。结果表明,接菌48h后 *GhSUMO* 基因表达明显上调,96h达到5倍以上(图8)。陆地棉抗病品种豫棉21号的 *GhSUMO* 基因受黄萎病菌诱导上调表达,推断该基因参与陆地棉对黄萎病的响应,与抗黄萎病相关。

2 讨论

真核生物 SUMO 的 C 端均具有保守的双 Gly 的断裂与连接位点及泛素结构域。同泛素相比, SUMO 具有典型的正负电荷区和富柔性的 N 端延伸区,其中延伸区域富含带电荷的 Gly 和 Pro,可为蛋白-蛋白互作提供特异的结构基础(Muller et al., 2001)。在 SUMO 家族成员中, N 端延伸区结构有较大的差异,可能正是这些特异性的结构基础决定了家族成员功

能的多样性(Saitoh and Hinchey, 2000)。

真核生物的 SUMO 化修饰机理是通过异肽键和靶蛋白连接,进而介导靶蛋白分子定位和调节靶蛋白的功能。多年的研究表明, SUMO 化修饰参与广泛的代谢途径,在防御疾病(Hanania et al., 1999)以及应对非生物胁迫(Kurepa et al., 2003; Miura et al., 2007b; Saracco et al., 2007)、激素信号转导(Lee et al., 2007)及植物生长发育(Murtas et al., 2003; Jin et al., 2007)等方面发挥着重要作用。

随着研究的日益深入, SUMO 化修饰介导抗病防御的机制被逐渐阐释。Orth 等(2000; 2002)研究者发现植物病原体释放的毒力效应子(efactor) YopJ 具有 SUMO 蛋白酶活性,推测其通过水解 SUMO (去 SUMO 化)使植物抗病防御反应降低或失效。XopD 在病菌感染植物体期间,可模拟植物内源的 SUMO 异构肽,通过影响 SUMO 化水平,干扰宿主蛋白的防御作用(Hotson et al., 2003)。此外,有学者鉴定出在宿主中, XopD 的效应蛋白可以作为 SUMO 蛋白酶,通过去 SUMO 化减弱 SUMO 化修饰物的积累量(Gürlebeck et al., 2006)。SUMO 结合酶和连接酶在植物抗病防御中也扮演着重要角色。有人从烟草中曾分离出 SUMO 结合酶 Ubc9 的同系物,并发现该蛋白可以同菜豆金黄花叶病毒属的 Rep/RepAC1 蛋白互作(Castillo et al., 2004)。2007 年 Lee 和他的同事发现, SUMO 连接酶突变体 *siz1* 植物中,水杨酸的积累量比野生型显著提高,同时,病程相关(pathogenesis-related, PR)基因的表达量同时上调,大大增强了突变植物的抗病能力。

本研究通过接菌诱导和实时定量 PCR 分析,结果显示,陆地棉 *GhSUMO* 基因在苗期接菌后 48 h 呈现明显的上调,而到 96 h 则达到 5 倍以上,被明显诱导表达,说明 *GhSUMO* 基因参与了陆地棉抗病的过程,可能在棉花抗黄萎病中发挥重要作用。我国抗黄萎病陆地棉标准品种豫棉 21 号 *GhSUMO* 基因的克隆和初步分析,为进一步研究棉花抗黄萎病分子机理和抗病分子育种创造了新的基础条件。

3 材料与方法

3.1 试验材料

供试棉花品种为陆地棉抗黄萎病品种豫棉 21 号,由河南省农业科学院经济作物所棉花育种研究室提供。供试菌系为棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae* Kleb) W 菌系,由河南农业大学植物保护学院提供。

DNA Marker、质粒及 PCR 产物回收试剂盒购自

天根生物制品公司(北京)电泳级琼脂糖购自 Amresco 公司(美国)。Taq 酶和 pMD18-T 克隆载体购自大连宝生物程公司(大连) cDNA 第一链合成采用 Invitrogen 公司的 PrimeScript™ RT-PCR Kit 试剂盒(美国);引物合成和基因测序由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

3.2 总 DNA、RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

基因组 DNA 的提取采用改良 CTAB 法(宋国立等, 1998) 棉花根部总 RNA 提取采用天恩泽基因 Column Plant RNAout Kit 试剂盒。cDNA 第一链合成采用 Invitrogen PrimeScript™ RT-PCR Kit 提供的方法。

3.3 电子克隆

以 SSH 技术得到的差异表达序列为查询探针(query probe) 检索棉花 EST 库, 得到同源性高的棉花 EST; 以得到的棉花 EST 为查询探针, 再次检索 dbEST, 得到由部分重叠的 EST 进行拼接, 再以拼接后的序列为查询探针, 依次进行 EST 拼接。

3.4 基因扩增、克隆、测序

根据电子克隆获得的编码区完整的 cDNA 序列, 在 3' 和 5' 端非翻译区设计特异引物, SUMOF: 5'-TTTAGCGGCTCCTTTTGT-3' 和 SUMOR 5'-GT TTTGTTCCAGGGTGTTC-3'。分别以豫棉 21 号基因组 DNA 和反转录 cDNA 为模板扩增基因。PCR 程序为: 94℃预变性 10 min, 94℃变性 45 s, 57℃复性 45 s, 72℃延伸 90 s, 32 个循环, 72℃延伸 10 min。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳纯化回收 PCR 产物, 连接到 pMD18-T simple 载体上, 转化感受态大肠杆菌 DH5α, 挑选阳性克隆进行 PCR 及酶切鉴定, 委托北京六合华大基因科技股份有限公司进行 DNA 序列测序。

3.5 生物信息学分析

用 DNAMAN 软件对 SUMO 基因的开放阅读框(ORF)进行物种间多重比较及进化分析。根据 ExPASy proteomics tools 系统(<http://www.expasy.ch/tools/>)中的 GOR4 蛋白质二级结构模型预测软件进行蛋白质二级结构预测分析。根据 NCBI Specialized BAST 中在线分析工具 Conserved Domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行蛋白质保守域预测和分析。

3.6 基因表达谱分析

将 0.25 g 升汞溶于 0.6 mL 浓盐酸中, 加水 250 mL,

充分溶解。然后取少量溶液处理棉花种子, 具体办法: 将种子置于烧杯中, 加入升汞溶液直淹没种子, 放置 3~5 min, 然后用无菌水冲洗 4~5 次。消毒后播种与无底纸钵的灭菌营养土中。在温室内(昼温 25℃~28℃, 夜温 20~23℃)培养, 定期浇 Hoagland 营养液和水, 当棉苗两片真叶平展时, 接种黄萎病菌孢子菌液(1.4×10^7 个/mL), 分别于接菌后 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 和 96 h 提取豫棉 21 号根的总 RNA。

以各时点 cDNA 为模板、以棉花组成型表达的 18S rRNA 基因(JF699283)为内部参照, 进行相对定量 PCR 分析。*GhSUMO* 基因及内参基因的定量引物序列分别为: SUMOF 5'-AAGTCAAAGGCCAGGACGGAA-3' 和 SUMOR 5'-CGGCGACCATCGAACAA GAAGG-3', 18SF 5'-TGAAGAACGCAGCGAAAT-3' 和 18SR 5'-ATGCTCCAAGGAATACCAAG-3'。

实时定量 PCR 反应程序采用三步法, 其中在延伸阶段收集荧光信号, 反应结束后, 添加溶解曲线, 便于分析扩增的特异性。具体反应条件如下: 94℃变性 10 min, 94℃变性 30 s, 60℃复性 10 s, 72℃延伸 30 s, 共进行 40 个循环, 最后一轮 72℃延伸 10 min。

作者贡献

赵付安负责整个实验方案的制定与实施, 文章构架的拟定, 论文主要内容修订与统稿; 杨晓杰负责初稿撰写、主要图片的制作和部分内容修改。谢德意负责实验指导和研究过程中工作协调; 李武负责实验材料准备和相关文献收集; 吕淑萍参与接菌实验和温室管理; 房卫平负责研究方向与计划拟定、科研及写作指导。

致谢

我们向为本研究提供资助的“国家转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08005-005-3)”表示感谢, 向河南农业大学植保学院提供棉花黄萎病菌菌株表示真诚的感谢。

参考文献

- Castillo A.G., Kong L.J., Hanley-bowdoin L., and Bejarano E.R., 2004, Interaction between a geminivirus replication protein and the plant sumoylation system, *J. Virol.*, 78(6): 2758-2769
- Chen Q., and Shi Y.Y., 2004, Progress in SUMO modification research, *Shengming Kexue (Chinese Bulletin of Life Sciences)*, 16(1): 1-6 (陈泉, 施蕴渝, 2004, 小泛素相关修饰物 SUMO 研究进展, *生命科学*, 16(1): 1-6)

- Cheng H.M., Jian G.L., Ni W.C., Yang H.H., Wang Z.X., Sun W. J., Zhang B.L., Wang X.F., Ma C., and Jia S.R., 2005, Increase of *Fusarium*- and *Verticillium*-resistance by transferring chitinase and glucanase gene into cotton, *Zhongguo Nongye Kexue* (Scientia Agricultura Sinica), 38(6): 1160-1166 (程红梅, 简桂良, 倪万潮, 杨红华, 王志兴, 孙文姬, 张保龙, 王晓峰, 马存, 贾士荣, 2005, 转几丁质酶和 β -1,3- 葡聚糖酶基因提高棉花对枯萎病和黄萎病的抗性, 中国农业科学, 38(6): 1160-1166)
- Gao Y.L., Guo W.Z., Wang L., and Zhang T.Z., 2006, Isolation and characterization of resistance and defense gene analogs in cotton (*Gossypium barbadense* L.), *Sci. in China Series C* (Life Sci.), 49(6): 530-542
- Gürlebeck D., Thieme F., and Bonas U., 2006, Type effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant, *J. Plant Physiol.*, 163(3): 233-255
- Hanania U., Furman-matarasso N., Ron M., and Avni A., 1999, Isolation of a novel SUMO protein from tomato that suppresses EIX-induced cell death, *The Plant J.*, 19(5): 533-541
- Hotson A., Chosed R., Shu H.J., Orth K., and Mudgett M.B., 2003, *Xanthomonas* type effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta, *Mol. Microbiol.*, 50(2): 377-389
- Jin J.B., Jin Y.H., Lee J., Miura K., Yoo C.Y., Kim W.Y., van Oosten M., Hyun Y., Somers D.E., Lee I., Yun D.J., Bressan R.A., and Hasegawa P.M., 2007, The SUMO E3 ligase, *AtSIZ1*, regulates flowering by controlling a salicylic acid-mediated floral promotion pathway and through affects on *FLC* chromatin structure, *The Plant J.*, 53(3): 530-540
- Kurepa J., Walker J.M., Smalle J., Gosink M.M., Davis S.J., Durham T.L., Sung D.Y., and Vierstra R.D., 2003, The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*, accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress, *J. Biol. Chem.*, 278(9): 6862-6872
- Lee J., Nam J., Park H.C., Na G., Miura K., Jin J.B., Yoo C.Y., Baek D., Kim D.H., Jeong J.C., Kim D., Lee S.Y., Salt D.E., Mengiste T., Gong Q.Q., Ma S.S., Bohnert H.J., Kwak S.S., Bressan R.A., Hasegawa P.M., and Yun D.J., 2007, Salicylic acid-mediated innate immunity in *Arabidopsis* is regulated by SIZ1 SUMO E3 ligase, *The Plant J.*, 49(1): 79-90
- Miura K., Jin J.B., Lee J., Yoo C.Y., Stirn V., Miura T., Ashworth E.N., Bressan R.A., Yun D.J., and Hasegawa P.M., 2007b, SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 19(4): 1403-1414
- Muller S., Hoege C., Pyrowolakis G., and Jentsch S., 2001, SUMO, ubiquitin's mysterious cousin, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2(3): 202-213
- Murtas G., Reeves P.H., Fu Y.F., Bancroft I., Dean C., and Coupland G., 2003, A nuclear protease required for flowering-time regulation in *Arabidopsis* reduces the abundance of small ubiquitin related modifier conjugates, *The Plant Cell*, 15(10): 2308-2319
- Orth K., 2002, Function of the *Yersinia* effector YopJ, *Curr. Opin. Microbiol.*, 5(1): 38-43
- Orth K., Xu Z.H., Mudgett M.B., Bao Z.Q., Palmer L.E., Bliska J.B., Mangel W.F., Staskawicz B., and Dixon J.E., 2000, Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease, *Science*, 290(5946): 1594-1597
- Saitoh H., and Hinchey J., 2000, Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3, *J. Biol. Chem.*, 275(9): 6252-6258
- Saracco S.A., Miller M.J., Kurepa J., and Vierstra R.D., 2007, Genetic analysis of SUMOylation in *Arabidopsis*: Conjugation of SUMO1 and SUMO2 to nuclear proteins is essential, *Plant Physiol.*, 145(1): 119-134
- Song G.L., Cui R.X., Wang K.B., Guo L.P., Li S.H., Wang C.Y., and Zhang X.D., 1998, Improved CTAB method for extracting genomic DNA from cotton, *Mianhua Xuebao* (Cotton Science), 10(5): 215-217 (宋国立, 崔荣霞, 王坤波, 郭立平, 黎绍惠, 王春英, 张香娣, 1998, 改良 CTAB 法快速提取棉花基因组 DNA, 棉花学报, 10(5): 215-217)
- Tu L.L., Zhang X.L., Zhu L.F., Nie Y.C., and Guo X.P., 2003, Origin, diversity and evolution of nbs-type disease-resistance gene analogues in sea-island cotton (*Gossypium barbadense* L.), *Yichuan Xuebao* (Acta Genetica Sinica), 30(11): 1071-1077 (涂礼莉, 张献龙, 朱龙付, 聂以春, 郭小平, 2003, 海岛棉 NBS 类抗病基因类似物的遗传多样性及进化, 遗传学报, 30(11): 1071-1077)
- Wu J.H., Zhang X.L., Luo X.L., Nie Y.C., Tian Y.C., and Chen Z.H., 2004, Transgenic cotton plants of chitinase and glucanase genes and their performance of resistance to *Verticillium dahliae*, *Yichuan Xuebao* (Acta Genetica Sinica), 31(2): 183-188 (吴家和, 张献龙, 罗晓丽, 聂以春, 田颖川, 陈正华, 2004, 转几丁质酶和葡聚糖酶基因棉花的获得及其对黄萎病的抗性, 遗传学报, 31(2): 183-188)