

NaCl 和 Na₂CO₃ 胁迫下的高粱 MAPKs 基因家族表达模式

陈宏宇¹, 冯树丹¹, 刘相国², 尹悦佳², 于莹³, 杨丽颖¹, 郝东云^{2,3}

(1. 哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 哈尔滨 150025;

2. 吉林省农业科学院 生物技术研究中心, 长春 130033; 3. 吉林大学 生命科学学院, 长春 130012)

摘要: 通过在全基因组水平上进行 NaCl 和 Na₂CO₃ 胁迫下高粱 MAPKs 基因表达模式的研究, 探索高粱 MAPKs 基因在胁迫条件下参与信号传导的机理. 结果表明, 从高粱基因组中鉴定出 16 个 MAPKs 基因, 命名为 *SbMPKs*. 这些 *SbMPKs* 在 NaCl 和 Na₂CO₃ 胁迫下的表达模式明显不同, 表明中性盐胁迫诱导的信号响应不同于碱性盐. 在 NaCl 胁迫下, 除了 *SbMPK13* 的表达量在 12 h 时达到最大值外, 所有高粱 MAPKs 基因在 24 h 内表达持续上调; 在 Na₂CO₃ 胁迫下, 只有 *SbMPK3*, *SbMPK10* 和 *SbMPK13* 表达上调, 表明这 3 个基因可能与高粱碱性盐胁迫应答反应有关. 系统发育分析表明, *SbMPK13* 属于 C 组 MAPKs 基因, 并且与水稻中受脱落酸 (ABA) 和盐胁迫诱导表达的 *OsMAPK2* 亲缘关系较近, 进一步证实了 *SbMPK13* 可能是参与高粱盐胁迫应答的重要调控基因.

关键词: 高粱; MAPKs 基因; 表达模式; 计算识别; 盐碱胁迫

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-5489(2012)01-0139-08

Expression Pattern of MAPKs Genes in *Sorghum bicolor* under Stresses of NaCl and Na₂CO₃

CHEN Hong-yu¹, FENG Shu-dan¹, LIU Xiang-guo², YIN Yue-jia², YU Ying³,
YANG Li-ying¹, HAO Dong-yun^{2,3}

(1. College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China;

2. Biotechnology Research Center, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China;

3. College of Life Science, Jilin University, Changchun 130012, China)

Abstract: The availability of sorghum genome makes it possible to perform the genome-wide analysis of the expression profile of MAPKs genes in *Sorghum bicolor* under the stresses of NaCl and Na₂CO₃ so as to explore the MAPKs involvement into saline-alkali signaling pathway. The results show that 16 MAPKs genes were identified from the genome of *Sorghum bicolor*, namely *SbMPKs*, and their expression profiles under the stresses of NaCl and Na₂CO₃ differ from each other significantly. This suggests that neutral salt-induced signal response may differ from that induced by alkaline salt. Under the stress of NaCl, all *SbMPKs* were up-regulated continuously during 24 h except the *SbMPK13* whose expression reached to the maximum at 12 h.

收稿日期: 2011-04-25.

作者简介: 陈宏宇(1981—), 男, 汉族, 硕士研究生, 从事生物化学与分子生物学的研究, E-mail: chy810501@163.com.
通讯作者: 冯树丹(1960—), 女, 汉族, 博士, 教授, 从事应用生化工程的研究, E-mail: sdf6616@sohu.com; 郝东云(1962—), 男, 汉族, 博士, 教授, 博士生导师, 从事植物分子生物学的研究, E-mail: dyhao@cjaas.com.

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项基金(批准号: 2008ZX08003-005)和吉林省科技发展计划项目(批准号: 20086029).

Under the stress of Na_2CO_3 , however, only *SbMPK3*, *SbMPK10* and *SbMPK13* were up-regulated, implying that *SbMPKs* are likely responsible specifically for alkaline salt stress in sorghum. Phylogenetic analysis classified *SbMPK13* into the C group of *MAPKs*, which is similar to *OsMAPK2* that is responsible to ABA and salt stress in rice, further confirming that it is involved possibly in the regulation of salt stress response genes in sorghum.

Key words: *Sorghum bicolor*; *MAPKs* gene; expression pattern; computational identification; saline-alkali stress

近年来,关于植物耐盐碱性的研究有了很大进展.但目前这些研究大多数以中性盐(NaCl)为主,对碱性盐(Na_2CO_3 和 NaHCO_3)的研究报道较少.研究证实,中性盐胁迫和碱性盐胁迫的作用机理明显不同:中性盐胁迫通常是由盐浓度引起的渗透胁迫和以 Na^+ 等有害离子引起的离子胁迫产生的;而碱性盐胁迫除了能引起渗透胁迫和离子胁迫外,还会产生由 CO_3^{2-} 和 HCO_3^- 引起的高pH值胁迫,对植物的危害更大^[1].

高粱(*Sorghum bicolor*)是一种重要的粮食、饲料和能源作物,不但具有较强的耐中性盐能力,在田间和水培实验中也同样表现出较强的耐碱性盐能力.因此,开展高粱耐盐碱机理的研究对利用现代生物技术改良作物耐盐碱能力、提高作物产量、改良盐碱化土地具有重要意义^[2].

促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, *MAPKs*)是一类真核生物中高度保守的、参与生长发育和胁迫应答调控的蛋白因子^[3-6].目前,人们已经从拟南芥^[7-10]、烟草^[11-12]、水稻^[13-17]等多种植物中分离得到了*MAPKs*基因.研究表明,植物*MAPKs*基因家族在盐胁迫刺激的信号转导过程中具有重要作用.在烟草中,Mikolajczyk等^[12]发现,属于*MAPKs*基因家族的ASK1与植物的高渗透胁迫应答反应有关;在黄瓜根中,*CsNMAPK*的表达受到盐胁迫和渗透胁迫的诱导^[18];苜蓿的SIMK基因表达不仅受到 NaCl 胁迫的诱导,还受到 KCl 和山梨醇胁迫的诱导^[19].*MAPKs*基因在高粱耐盐碱胁迫应答反应中是否也同样发挥重要作用,而且不同的*MAPKs*基因在中性盐胁迫和碱性盐胁迫下响应机理是否不同等问题目前尚未见文献报道.

高粱全基因组测序的完成为人们系统性地研究高粱*MAPKs*基因家族成员的数量、序列结构、序列特性及盐碱胁迫下的表达模式等提供了必要的信息^[20].本文利用计算识别的方法得到了高粱*MAPKs*基因家族的全部成员,并对高粱*MAPKs*基因的序列以及中性盐胁迫和碱性盐胁迫下基因表达模式进行分析,构建了系统进化树,为解析高粱*MAPKs*基因与耐盐碱机理的关系提供了进一步的科学依据.

1 材料与方法

1.1 高粱*MAPKs*基因的计算识别

在NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中查找已报道的植物*MAPKs*基因,下载这些基因的蛋白质序列,利用CLUSTALX软件对这些蛋白质序列进行多序列比对分析;从phytozome数据库(<http://www.phytozome.net/>)中下载高粱基因组数据包中的蛋白质序列数据包;从GenBank数据库中下载已经分离得到的植物*MAPKs*蛋白质序列,建立本地蛋白质序列数据集,利用CLUSTALX软件对这些已经公布的*MAPKs*蛋白质序列进行多序列比对.利用美国华盛顿大学药学院开发的HMMER 2.3.2软件包(Linux操作系统)中的hmmbuild程序将多序列比对结果转化成序列搜索器,保存为*.hmm文件;再利用HMMER 2.3.2(隐马尔科夫)软件包中的hmmsearch程序对高粱的蛋白质序列数据包进行搜索.利用PLANTSP程序识别已搜索得到的蛋白质保守结构域,如果一个被识别的蛋白质序列包含MAP激酶的特征,即把它视为高粱*MAPKs*基因家族成员的预测结果.利用CELLO v2.5服务器(<http://cello.life.nctu.edu.tw/>)预测*MAPKs*基因的亚细胞定位.

1.2 高粱*MAPKs*基因的系统进化树构建

利用CLUSTALX在线程序(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>)对计算识别出的高粱*MAPKs*

基因进行多序列比对;再利用 MEGA v3.1 程序和多序列比对结果进行系统进化树的构建,构建系统进化树的选项中,选择 neighbor-joining(NJ)方法,Bootstrap 选项中设定重复 1 000 次,最后利用 Treeview 软件查看构建的系统进化树,可选择不同的树型以显示构建结果。

1.3 高粱盐碱胁迫模型的建立

植物材料高粱选用测序品种 BT623^[20],由吉林省农业科学院提供。在培养箱中 25 ℃ 萌发一周后,转至温室中以蛭石为基质进行培养。光照时间 16 h,温度 25 ℃。待幼苗生长至三叶期时(大约 3 周),选取长势一致的幼苗用 400 mmol/L NaCl 和 200 mmol/L Na₂CO₃ 进行处理(参照 Singla-Pareek 等的处理浓度^[21],同时保持两种处理溶液中 Na⁺ 浓度一致),在胁迫处理 0,2,6,12,24 h 后取全植株用液氮冻存,于 -80 ℃ 冰箱中保存备用。

1.4 荧光定量 PCR 引物的设计与验证

根据高粱 MAPKs 基因的序列,利用 Primer Premier 5.0 软件,按照荧光定量 PCR 的引物设计原则设计引物,结果列于表 1,由生工生物工程(上海)有限公司合成引物。利用 RNA 提取试剂盒 RNAiso(大连宝生物工程公司)提取高粱的总 RNA,利用反转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司)合成 cDNA 的第一条链。再利用合成的引物进行 PCR 扩增,PCR 产物测序验证正确后,可用于荧光定量 PCR 实验,测序由生工生物工程(上海)有限公司完成。

表 1 用于荧光定量 PCR 的高粱 MAPKs 基因引物

Table 1 Primers of MAPKs genes used for real-time quantitative PCR

基因名称	引物序列	
<i>SbMPK1</i>	F: 5'-CGTTTCGTGCCCCGTTTG-3'	R: 5'-TGAACGCCCAGATTTGGAGC-3'
<i>SbMPK2</i>	F: 5'-CGTTCCTTCCCATCACGCC-3'	R: 5'-GCCGTCACCTCGTCACTGTTCCCTA-3'
<i>SbMPK3</i>	F: 5'-TGGAGACACCAAAGACCCCTAT-3'	R: 5'-CTGCCGATAGATGATGAAAAGG-3'
<i>SbMPK4</i>	F: 5'-TTGCTTGGCGGTGTTTCGTC-3'	R: 5'-CGGTTTGCATCCCCGTAC-3'
<i>SbMPK5</i>	F: 5'-ATCCTAAGGATCGACCAACGG-3'	R: 5'-CAGCCAACGCTGGTCAT-3'
<i>SbMPK6</i>	F: 5'-AAAGGAAGTTATGGCGTGTGTTGC-3'	R: 5'-CAGGATGGCGTAATAGCCGAAGT-3'
<i>SbMPK7</i>	F: 5'-CTACTTGGCACTCCTTCATCAGA-3'	R: 5'-AACGCCAGGGGTAACAATA-3'
<i>SbMPK8</i>	F: 5'-CGGTTACCTTTTCTTGGAGTGG-3'	R: 5'-GGATTCAAGGACTCGAACGGA-3'
<i>SbMPK9</i>	F: 5'-TTCTTCGGCTGCTTCGTC-3'	R: 5'-AGCGGTGATGCTCTGGAGTC-3'
<i>SbMPK10</i>	F: 5'-GACCACCCCTACGGCATTG-3'	R: 5'-GTCAGCATGGCTCAAATAGGAC-3'
<i>SbMPK11</i>	F: 5'-ACACGGAGATGACGGACGCC-3'	R: 5'-CGGACCAGACGATGCCGTAG-3'
<i>SbMPK12</i>	F: 5'-GGTGGCTGTGACGGTTAGG-3'	R: 5'-GCTTGGCGTCGATGTGCTT-3'
<i>SbMPK13</i>	F: 5'-CCAGGCATTCCCCTCACC-3'	R: 5'-TGTGAGGACCTCGGGATGG-3'
<i>SbMPK14</i>	F: 5'-TAGACACCAAATATGTGCCGATCA-3'	R: 5'-GGCGGAGATGGCGTAGGA-3'
<i>SbMPK15</i>	F: 5'-CGTCGTCTGTTTCTGTTTCCA-3'	R: 5'-CAGTTTCAGTTGTGCTCCTTGC-3'
<i>SbMPK16</i>	F: 5'-CGAGACTTGGTGAGGAGTGAGC-3'	R: 5'-GAGGCTGCTACTTGTGCCGTGAT-3'

1.5 荧光定量 PCR 实验

利用美国 ABI 公司的 7500 型荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 PCR 实验。PCR 反应体系为 20 μL,其中包含: 10 μL SYBR[®] Green I(日本 TOYOBO 公司), 1 μL 正向引物(10 μmol/L), 1 μL 反向引物(10 μmol/L), 7 μL H₂O。PCR 反应程序为: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 40 s, 72 ℃ 60 s, 读板, 40 个循环; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 60 s, 95 ℃ 15 s 绘制溶解曲线。以 Actin 基因为内参基因, Actin 基因的引物为 Actin-F: 5'-GAGCCATTATCACCAGCTCC-3', Actin-R: 5'-TAGTAGCCTCATCAGGCATCTCAT-3'。

2 结果与分析

2.1 高粱 MAPKs 基因的计算识别和序列分析

为了获得高粱 MAPKs 基因家族全部成员的序列,本文以已报道的其他植物 MAPKs 蛋白质序列为训练集,利用 HMM2.3.2 模型建立搜索程序。利用该程序对高粱基因组测序数据进行计算识别。表 2 列出了所获得的 16 个高粱 MAPKs 基因序列。根据这些基因序列的运算得分,从高到低排序,命名为

SbMPKs ($s = 1, 2, \dots, 16$). 通过蛋白质多重序列比对发现每个高粱 *MAPKs* 基因编码的蛋白质序列在活化 MAP 激酶必须的 VII 和 VIII 亚区之间有一个 T[D/E]Y 模式, 如图 1 所示. 利用 PLANTSP 程序识别这些搜索序列的保守区, 发现这些序列都具有 MAP 激酶的模式和特征, 证明计算识别获得的 *MAPKs* 基因家族成员真实可靠.

表 2 本文获得的高粱 *MAPKs* 基因家族成员
Table 2 *MAPKs* genes identified in *Sorghum bicolor*

基因名称	基因编号	得分	染色体	氨基酸长度	外显子数/个	亚细胞定位
<i>SbMPK1</i>	Sb09g003280.1	971.8	9	557	10	细胞核; 细胞质
<i>SbMPK2</i>	Sb10g029400.1	947.6	10	575	11	细胞核
<i>SbMPK3</i>	Sb03g028740.1	947.6	3	614	10	细胞核
<i>SbMPK4</i>	Sb09g029720.1	922.9	9	599	10	细胞核
<i>SbMPK5</i>	Sb09g028690.1	912.5	9	591	10	细胞核
<i>SbMPK6</i>	Sb03g030450.1	911.5	3	581	9	细胞核; 细胞质; 线粒体
<i>SbMPK7</i>	Sb03g029340.1	908.5	3	429	10	细胞质
<i>SbMPK8</i>	Sb09g029370.1	904.4	9	593	11	细胞核; 细胞质
<i>SbMPK9</i>	Sb04g002830.1	859.7	4	491	10	细胞核
<i>SbMPK10</i>	Sb05g010000.1	855.2	5	411	7	细胞质
<i>SbMPK11</i>	Sb10g003810.1	830.5	10	403	6	细胞质
<i>SbMPK12</i>	Sb01g030680.1	810.9	1	378	6	细胞质; 线粒体
<i>SbMPK13</i>	Sb10g028780.1	787.5	10	370	2	细胞核
<i>SbMPK14</i>	Sb04g003480.1	783.3	4	371	2	细胞核
<i>SbMPK15</i>	Sb07g003810.1	781.1	7	389	6	细胞质
<i>SbMPK16</i>	Sb01g038750.1	776.9	1	375	6	细胞质

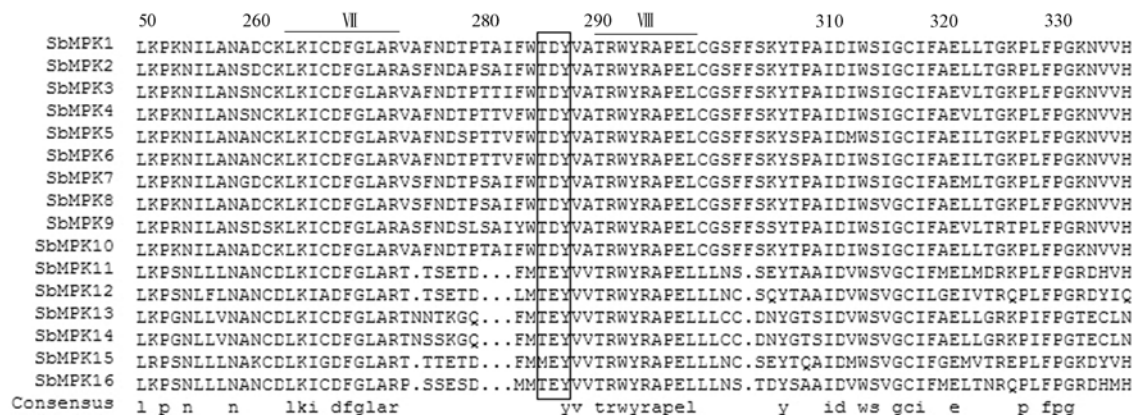


图 1 高粱 *MAPKs* 的蛋白质序列比对结果

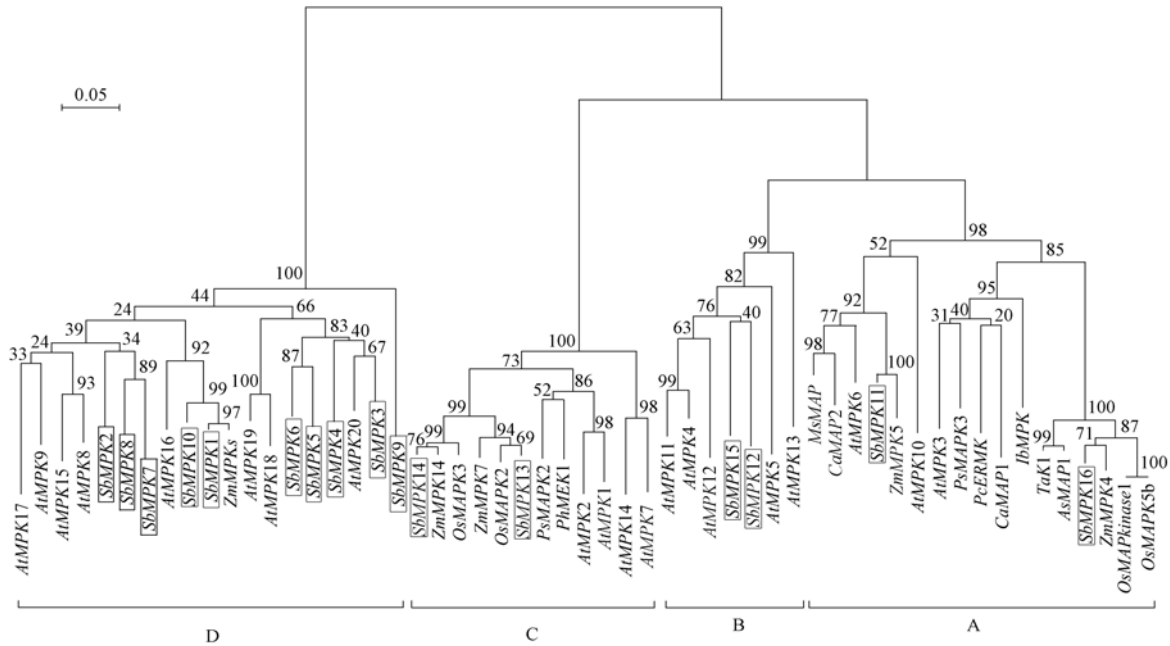
Fig. 1 Multiple sequence alignment of the deduced amino acid sequences of *MAPKs* genes in *Sorghum bicolor*

序列分析结果表明, 高粱 *MAPKs* 基因家族各成员的序列长度、外显子数、染色体定位等差异显著. 外显子数最少 2 个, 最多 11 个. 氨基酸长度最短 370 个, 最长 614 个. 亚细胞定位预测结果显示: *SbMPK2*, *SbMPK3*, *SbMPK4*, *SbMPK5*, *SbMPK9*, *SbMPK13* 和 *SbMPK14* 专一定位在细胞核中; 而 *SbMPK7*, *SbMPK10*, *SbMPK11*, *SbMPK15* 和 *SbMPK16* 专一定位在细胞质上; *SbMPK12* 定位在细胞质和线粒体上; *SbMPK6* 定位在细胞核、细胞质和线粒体上.

2.2 高粱 *MAPKs* 基因的系统进化分析

考虑到系统进化关系相近的基因可能具有相似的功能^[22], 本文将高粱、拟南芥、水稻、玉米等 12 种植物已知 *MAPKs* 蛋白质序列进行聚类分析. 使用 NJ 方法构建进化树, 重复完成 1 000 个进化自展测试. 用 MEGA v3.1 软件呈现进化树, 如图 2 所示. 进化树的结构表明: 高粱 *MAPKs* 基因家族成员与单子叶植物玉米和水稻的亲缘关系较近, 与双子叶植物拟南芥亲缘相对较远. 高粱 *MAPKs* 基因分布

趋势与其他植物 MAPKs 基因分布相近, 划分成明显的 A, B, C, D 共 4 个组. 进化树数据的获得为比较、分析和验证高粱 MAPKs 基因家族成员的功能提供了进一步的理论证据.



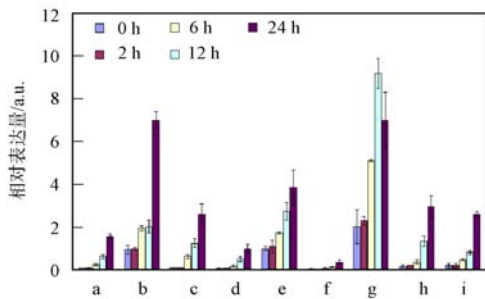
燕麦: As, *Avena sativa*; 拟南芥: At, *Arabidopsis thaliana*; 辣椒: Ca, *Capsicum annuum*; 甘薯: Ib, *Ipomoea batatas*; 紫花苜蓿: Ms, *Medicago sativa*; 水稻: Os, *Oryza sativa*; 杏: Pc, *Petroselinum crispum*; 矮牵牛: Ph, *Petunia hybrida*; 豌豆: Ps, *Pisum sativum*; 高粱: Sb, *Sorghum bicolor*; 小麦: Ta, *Triticum aestivum*; 玉米: Zm, *Zea mays*.

图 2 部分植物 MAPKs 基因的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of MAPKs genes of various plants

2.3 中性盐和碱性盐胁迫下的 MAPKs 基因表达模式分析

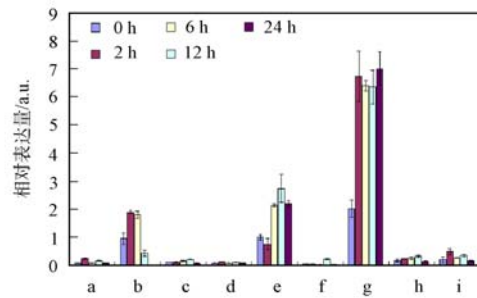
为了解析高粱 MAPKs 基因与盐碱胁迫间的关系, 本文利用荧光定量 PCR 技术对 NaCl 和 Na₂CO₃ 胁迫下 0~24 h 高粱中 MAPKs 基因的表达模式进行差异比较分析, 结果如图 3 和图 4 所示. 按照荧光定量 PCR 的引物设计原则设计引物, 通过 PCR 和测序验证引物设计的正确性和扩增效果. 结果表明, *SbMMPK1*, *SbMMPK3*, *SbMMPK7*, *SbMMPK8*, *SbMMPK10*, *SbMMPK12*, *SbMMPK13*, *SbMMPK14* 和 *SbMMPK16* 能够扩增得到目标序列, 测序结果进一步证实设计的引物可以用于荧光定量 PCR 实验. 由于 MAPKs 基因家族涉及植物体的多种生理生化和发育调控过程, 使用幼苗期单一的盐碱胁迫可能无法使全部基因充分表



a. *SbMMPK1*; b. *SbMMPK3*; c. *SbMMPK7*; d. *SbMMPK8*; e. *SbMMPK10*; f. *SbMMPK12*; g. *SbMMPK13*; h. *SbMMPK14*; i. *SbMMPK16*.

图 3 高粱 MAPKs 基因在 400 mmol/L NaCl 胁迫下的表达模式

Fig. 3 Expression pattern of MAPKs genes in *Sorghum bicolor* under the stress of 400 mmol/L NaCl



a. *SbMMPK1*; b. *SbMMPK3*; c. *SbMMPK7*; d. *SbMMPK8*; e. *SbMMPK10*; f. *SbMMPK12*; g. *SbMMPK13*; h. *SbMMPK14*; i. *SbMMPK16*.

图 4 高粱 MAPKs 基因在 200 mmol/L Na₂CO₃ 胁迫下的表达模式

Fig. 4 Expression pattern of MAPKs genes in *Sorghum bicolor* under the stress of 200 mmol/L Na₂CO₃

达,所以本文只得到9个基因的扩增产物. 荧光定量PCR实验共获得2种盐胁迫、5个时间点、9个高粱MAPKs基因的定量表达数据. 由图3和图4可见,大部分高粱MAPKs基因家族成员(*SbMPK1*, *SbMPK3*, *SbMPK7*, *SbMPK8*, *SbMPK10*, *SbMPK13*, *SbMPK14*和*SbMPK16*)在400 mmol/L NaCl中性盐胁迫下都呈现显著的表达上调. 而在200 mmol/L Na_2CO_3 碱性盐胁迫下仅有*SbMPK3*, *SbMPK10*和*SbMPK13*这3个基因表达明显上调.

高粱MAPKs基因在NaCl胁迫和 Na_2CO_3 胁迫下的表达模式存在一定的差异. 在NaCl胁迫下,大部分基因在6 h开始表达显著上调,随后表达量持续增加. 而*SbMPK13*基因较特殊,表现为在胁迫12 h时表达量达到最高值,随后呈下降趋势. 在 Na_2CO_3 胁迫下,*SbMPK3*, *SbMPK10*和*SbMPK13*的表达随胁迫时间的延长,表达量变化也具有明显差异. *SbMPK3*和*SbMPK13*胁迫响应时间都开始于2 h, *SbMPK3*的表达在6 h后显著下降,而*SbMPK13*的表达随胁迫时间延长一直维持较高的水平; *SbMPK10*与前两者不同,胁迫响应时间开始于6 h. 这3个基因都表现出响应时间短、敏感和迅速等特点,是与NaCl胁迫的不同之处.

3 讨论

土壤盐碱化严重影响农作物的产量和质量,而提高农作物的耐盐碱能力是开发和利用盐碱化土壤的有效方法之一. 目前,关于植物耐盐碱性的研究大多数以中性盐NaCl胁迫为主^[23-25]. 而在碱性盐胁迫研究方面,相关报道多数为 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 胁迫下植物生理生化水平的研究^[26],分子机理研究较少. 中性盐胁迫和碱性盐胁迫之间存在联系,但分子调控机制有所不同^[27]. 中性盐胁迫主要以渗透胁迫和离子胁迫为主,碱性盐胁迫除了同样涉及中性盐胁迫的因素外,还增加了由 CO_3^{2-} 和 HCO_3^- 引起的pH值胁迫,碱性盐胁迫实际面临渗透胁迫、离子胁迫和pH值胁迫等三方面因素的胁迫. 因此,研究中性盐和碱性盐胁迫的分子调控机理对于提高农作物的耐盐碱能力具有重要意义.

目前,对水稻、玉米和小麦等几种主要农作物的耐盐性研究已有许多报道^[28-31],而高粱作为一种重要的耐盐碱性较强的粮食和饲料作物,对其研究报道较少. 同时,MAPKs基因在植物逆境胁迫应答方面具有重要作用. 因此,本文研究了高粱MAPKs基因在盐碱胁迫下的表达模式. 在NaCl胁迫下,共有8个高粱MAPKs基因表达上调,而在 Na_2CO_3 胁迫下,只有3个基因表达上调,胁迫响应基因数量的不同表明高粱响应NaCl和 Na_2CO_3 胁迫机理可能不同. 此外,高粱MAPKs基因在NaCl胁迫和 Na_2CO_3 胁迫下的表达模式也有很大差异:在NaCl胁迫下,大部分MAPKs基因随胁迫时间的延长表达量持续增加,只有*SbMPK13*在12 h时表达量达到高峰;而在 Na_2CO_3 胁迫下,*SbMPK3*, *SbMPK10*和*SbMPK13*这3个基因在24 h内表达量都迅速上调并达到最大值. 表明高粱MAPKs基因对中性盐和碱性盐胁迫响应时间明显不同,高粱MAPKs基因对碱性盐胁迫更敏感,响应也更迅速.

进化关系相近的基因可能具有相似的功能,本文对高粱MAPKs进行了进化树比较分析,希望通过比较基因组学的研究方法验证高粱MAPKs的生物学功能. 结果表明,*SbMPK13*与水稻的*OsMAPK2*在进化上关系较近,提示它们可能具有相似的功能. He等^[32]研究表明,*OsMAPK2*的表达受到脱落酸(ABA)和盐胁迫的调控,鉴于*SbMPK13*与*OsMAPK2*的进化关系,推测*SbMPK13*可能是参与高粱盐碱胁迫应答的调控基因. 根据*OsMAPK2*基因的功能,可进一步推测*SbMPK13*的表达可能与ABA胁迫有关,但需要进一步的证实. 同时,本文研究表明,*SbMPK10*与拟南芥的*AtMAPK16*在进化上关系较近. Shi等^[33]研究表明,棉花*GhMPK16*与*AtMAPK16*在进化上关系也较近,同时棉花*GhMPK16*的表达也受到盐胁迫的调控,因此可以推测*SbMPK10*可能是参与高粱盐碱胁迫应答的调控基因,但也需进一步的证实. 此外,已知的植物MAPKs基因响应盐胁迫大多数为A组和B组中的成员,文献[8-10]的研究表明,属于拟南芥MAPKs中A组的*AtMPK4*基因和B组的*AtMPK6*基因与拟南芥在盐胁迫下的应答反应有关. 本文研究表明,高粱中除了A组和B组中的成员响应盐胁迫外,碳酸盐胁迫下应答显著的*SbMPK13*基因属于C组,而*SbMPK3*, *SbMPK10*基因属于D组,说明在C组和D组中也存在盐碱胁迫响应的MAPKs基因.

参 考 文 献

- [1] EI-Samad H M A, Shaddad M A K. Comparative Effect of Sodium Carbonate, Sodium Sulphate, and Sodium Chloride on the Growth and Related Metabolic Activities of Pea Plants [J]. J Plant Nutrition, 1996, 19(5): 717-728.
- [2] YUAN Cui-ping, WANG Yong-jun, WU Qiu-ping, et al. Advance and Perspective in Research on Sugar Accumulation and Its Regulation in Sweet *Sorghum stalks* [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2008, 10(3): 12-17. (袁翠平, 王永军, 吴秋平, 等. 甜高粱茎秆糖产量形成及其调控研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2008, 10(3): 12-17.)
- [3] Schaeffer H J, Weber M J. Mitogen-Activated Protein Kinases: Specific Messages from Ubiquitous Messengers [J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(4): 2435-2444.
- [4] Widmann C, Gibson S, Jarpe M B. Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module from Yeast to Human [J]. Physiol Rev, 1999, 79(1): 143-180.
- [5] Morrison D K, Davis R J. Regulation of MAP Kinase Signaling Modules by Scaffold Proteins in Mammals [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2003, 19: 91-118.
- [6] Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H. Emerging MAP Kinase Pathways in Plant Stress Signalling [J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(7): 339-346.
- [7] Mizoguchi T, Hayashida N, Yamaguchi K, et al. *ATMPKs*: A Gene Family of Plant MAP Kinases in *Arabidopsis thaliana* [J]. FEBS Lett, 1993, 336(3): 440-444.
- [8] Ichimura K, Mizoguchi T, Yoshida R, et al. Various Abiotic Stresses Rapidly Activate *Arabidopsis* MAP Kinases *ATMPK4* and *ATMPK6* [J]. Plant Journal, 2008, 24(5): 655-665.
- [9] Yuasa T, Ichimura K, Mizoguchi T, et al. Oxidative Stress Activates *ATMPK6*, an *Arabidopsis* Homologue of MAP Kinase [J]. Plant and Cell Physiology, 2001, 42(9): 1012-1016.
- [10] Petersen M, Brodersen P, Naested H, et al. *Arabidopsis* MAP Kinase 4 Negatively Regulates Systemic Acquired Resistance [J]. Cell, 2000, 103(7): 1111-1120.
- [11] Wilson C, Anghmayer R, Vicente O, et al. Molecular Cloning, Functional Expression in *Escherichia coli*, and Characterization of Multiple Mitogen-Activated-Protein Kinases from Tobacco [J]. Eur J Biochem, 1995, 233(1): 249-257.
- [12] Mikolajczyk M, Awotunde O S, Muszyska G, et al. Osmotic Stress Induces Rapid Activation of a Salicylic Acid Induced Protein Kinase and a Homolog of Protein Kinase ASK1 in Tobacco Cells [J]. Plant Cell, 2000, 12: 165-178.
- [13] Fu S F, Chou W C, Huang D D, et al. Transcriptional Regulation of a Rice Mitogen-Activated Protein Kinase Gene, *OsMAPK4*, in Response to Environmental Stresses [J]. Plant Cell Physiol, 2002, 43(8): 958-963.
- [14] Huang H J, Fu S F, Tai Y H, et al. Expression of *Oryza sativa* MAP Kinase Gene Is Developmentally Regulated and Stress-Responsive [J]. Physiol Plant, 2002, 114(4): 572-580.
- [15] Lieberherr D, Thao N P, Nakashima A, et al. A Sphingolipid Elicitor-Inducible Mitogen-Activated Protein Kinase Is Regulated by the Small GTPase *OsRac1* and Heterotrimeric G-Protein in Rice [J]. Plant Physiol, 2005, 138(3): 1644-1652.
- [16] Song F, Goodman R M. *OsBIMK1*, a Rice MAP Kinase Gene Involved in Disease Resistance Responses [J]. Planta, 2002, 215(6): 997-1005.
- [17] LIU Qing-po, XUE Qing-zhong. Computational Identification and Phylogenetic Analysis of the *MAPK* Gene Family in *Oryza sativa* [J]. Plant Physiol Biochem, 2007, 45(1): 6-14.
- [18] XU Hui-ni, LI Kun-zhi, YANG Feng-juan, et al. Overexpression of *CsNMAPK* in Tobacco Enhanced Seed Germination under Salt and Osmotic Stresses [J]. Molecular Biology Reports, 2009, 37(7): 3157-3163.
- [19] Munnik T, Ligterink W, Meskiene I, et al. Distinct Osmo-Sensing Protein Kinase Pathways Are Involved in Signaling Moderate and Severe Hyper-Osmotic Stress [J]. Plant Journal, 1999, 20(4): 381-388.
- [20] Paterson A H, Bowers J E, Bruggmann R, et al. The *Sorghum bicolor* Genome and the Diversification of Grasses [J]. Nature, 2009, 457: 551-556.
- [21] Singla-Pareek S L, Reddy M K, Sopory S K. Genetic Engineering of the Glyoxalase Pathway in Tobacco Leads to Enhanced Salinity Tolerance Tobacco Leads to Enhanced Salinity Tolerance [J]. PNAS, 2003, 100(25): 14672-14677.

- [22] Jonak C, Ligterink W, Hirt H. MAP Kinases in Plant Signal Transduction [J]. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 55(2): 204-213.
- [23] Munns R, Tester M. Mechanisms of Salinity Tolerance [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2009, 59: 651-681.
- [24] Kader M A, Lindberg S. Cellular Traits for Sodium Tolerance in Rice [J]. *Plant Biotech*, 2008, 25: 247-255.
- [25] Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H. Emerging MAP Kinase Pathways in Plant Stress Signalling [J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10: 339-346.
- [26] YAN Hong, ZHAO Wei, YIN Shang-jun, et al. Different Physiological Responses of *Aneurolepidium chinense* to NaCl and Na₂CO₃ [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2006, 15(6): 49-55. (颜宏, 赵伟, 尹尚军, 等. 羊草对不同盐碱胁迫的生理响应 [J]. *草业学报*, 2006, 15(6): 49-55.)
- [27] Kjello H, Susanne S, Abul M, et al. Improved Tolerance to Salinity and Low Temperature in Transgenic Tobacco Producing Glycine Betaine [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51: 177-185.
- [28] Kader M A, Seidel T, Gollmack D, et al. Expressions of *OsHKT1*, *OsHKT2*, and *OsVHA* Are Differentially Regulated under NaCl Stress in Salt-Sensitive and Salt-Tolerant Rice (*Oryza Sativa L.*) Cultivars [J]. *J Exp Bot*, 2006, 57(15): 4257-4268.
- [29] DING Dong, ZHANG Li-fang, WANG Hang, et al. Differential Expression of miRNAs in Response to Salt Stress in Maize Roots [J]. *Ann Bot*, 2009, 103(1): 29-38.
- [30] Munns R, James R A, Läuchli A. Approaches to Increasing the Salt Tolerance of Wheat and Other Cereals [J]. *J Exp Bot*, 2006, 57(5): 1025-1043.
- [31] WEN Jiang-qi, Oono K, Imai R. Two Novel Mitogen-Activated Protein Signaling Components, *OsMEK1* and *OsMAP1*, Are Involved in a Moderate Low-Temperature Signaling Pathway in Rice [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129(4): 1880-1891.
- [32] He X L, Hou X N, Shen Y Z, et al. TaSRG, a Wheat Transcription Factor, Significantly Affects Salt Tolerance in Transgenic Rice and Arabidopsis [J]. *FEBS Letters*, 2011, 585(8): 1231-1237.
- [33] SHI Jing, ZHANG Liang, AN Hai-long, et al. *GhMPK16*, a Novel Stress-Responsive Group D *MAPK* Gene from Cotton, Is Involved in Disease Resistance and Drought Sensitivity [J]. *BMC Molecular Biology*, 2011, 12: 22-37.

(责任编辑: 单 凝)