

小拟南芥 MKK 基因家族全基因组鉴定及进化和表达分析

李晓翠¹, 康凯程¹, 黄先忠^{2,3}, 范永斌¹, 宋苗苗¹, 黄韵杰¹, 丁佳佳¹

1. 石河子大学生命科学学院, 植物基因组学实验室, 石河子 832003

2. 安徽科技学院农学院, 凤阳 233100

3. 石河子大学生命科学学院, 石河子 832003

摘要: 丝裂原活化蛋白激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MAPKK 或 MKK)是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联的重要组成部分, 在植物的生长发育和胁迫应答过程中发挥重要作用。目前, 已在多种植物中鉴定了 MKK 基因家族, 但在十字花科植物小拟南芥(*Arabidopsis pumila*)中 MKK 基因家族的系统鉴定与分析尚未见报道。为了探索小拟南芥 MKK 基因家族的进化和功能, 本研究通过全基因组分析鉴定了小拟南芥中 16 个 MKK 基因, 散布于小拟南芥的 10 条染色体上。基于系统发育分析和多重序列比对, 将这些基因分为 5 个亚族: A 亚族(5 个)、B 亚族(2 个)、C 亚族(4 个)、D 亚族(3 个)和 E 亚族(2 个)。分子进化和共线性分析表明小拟南芥中存在 7 对复制基因, 分别是 *ApMKK1-1/1-2*、*ApMKK2-1/2-2*、*ApMKK3-1/3-2*、*ApMKK4-1/4-2*、*ApMKK5-1/5-2*、*ApMKK9-1/9-2* 和 *ApMKK10-1/10-2*, 其中 *ApMKK1-1/1-2* 在复制事件之后发生了加速进化。结合 *ApMKKs* 启动子区的顺式元件分布和 *ApMKKs* 在成熟叶片、茎、花和果实以及盐胁迫下的表达模式, 结果发现复制基因的表达具有组织特异性和功能多样性。部分复制基因在组织中的表达模式存在差异, 但在盐胁迫下的表达模式却基本相同。本研究结果为解析 MKK 介导的小拟南芥发育过程和非生物胁迫信号转导通路的复杂机制奠定了基础。

关键词: MKK; 小拟南芥; 基因家族; 组织表达; 盐胁迫

收稿日期: 2019-12-30; 修回日期: 2020-03-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: U1303302)和石河子大学国际科技合作项目(编号: GJHZ201806)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. U1303302), and International Science and Technology Cooperation Project of Shihezi University (No. GJHZ201806)]

作者简介: 李晓翠, 硕士研究生, 专业方向: 遗传学。E-mail: lxc360720@163.com

通讯作者: 黄先忠, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物响应逆境的分子机制。E-mail: xianzhongh106@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.19-388

网络出版时间: 2020/3/30 13:39:06

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20200330.1028.002.html>

Genome-wide identification, phylogenetic analysis and expression profiling of the MKK gene family in *Arabidopsis pumila*

Xiaocui Li¹, Kaicheng Kang¹, Xianzhong Huang^{2,3}, Yongbin Fan¹, Miaomiao Song¹, Yunjie Huang¹, Jiajia Ding¹

1. Plant Genomics Laboratory, College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi 832003, China

2. College of Agriculture, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China

3. College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi 832003, China

Abstract: Mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK or MKK) is an important component of the MAPK cascade, which plays important roles in plant growth and development as well as in various stress responses. At present, the MKK gene family has been identified in a variety of plants, but there has been no systematic study in Cruciferous plant *Arabidopsis pumila*. To explore the evolution and function of the MKK gene family in *Arabidopsis pumila*, 16 *ApMKK* genes were identified from the *Arabidopsis pumila* genome by genome-wide analysis, and they were distributed on 10 chromosomes of *Arabidopsis pumila*. According to phylogenetic analysis and multiple sequence alignment, these putative genes were divided into five known subfamilies, i.e. Groups A, B, C, D, and E, which includes 5, 2, 4, 3, 2 members, respectively. Evolutionary and syntenic analysis showed that there are seven pairs of duplication genes in *Arabidopsis pumila*: *ApMKK1-1/1-2*, *ApMKK2-1/2-2*, *ApMKK3-1/3-2*, *ApMKK4-1/4-2*, *ApMKK5-1/5-2*, *ApMKK9-1/9-2*, and *ApMKK10-1/10-2*. *Ka/Ks* and Tajima analysis indicated that evolution of *ApMKK1-1/1-2* was accelerated after the duplication event. Combining the distribution of cis-element in the promoter region of *ApMKKs* and the expression profile of *ApMKKs* in mature leaves, stems, flowers and fruits as well as under salt stress, we found that the expressions of paralogous genes (duplication genes) were tissue-specific and their functions were diversified. The expression patterns of some duplicated genes in tissues were different, but the expression patterns under salt stress were basically the same. These results lay the foundation for analyzing the complex mechanisms of MKK-mediated growth and development and abiotic stress signal transduction pathways in *Arabidopsis pumila*.

Keywords: mitogen-activated protein kinase kinase; *Arabidopsis pumila*; gene family; tissue expression; salt stress

植物在抵御外界不利环境刺激过程中已经进化出一套复杂而有效的防御机制来感知外部环境信号,并且在分子水平、细胞水平和生理水平等方面对各种胁迫作出响应,从而维持正常的生长和发育^[1]。在众多抗逆机制中,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联途径作为最重要的信号转导途径,能将细胞膜表面受体感知到的信号通过磷酸化和去磷酸化作用逐级放大并传递到细胞内,靶向激活胞质或核内的其他激酶、酶或转录因子等效应蛋白,调节特定基因的表达,从而使细胞、组织、器官、整个生物体作出相应的生理生化反应,进而适应环境和抵御逆境胁迫^[2-5]。MAPK 信号级联是一个进化保守的信号转导模块,

典型的 MAPK 级联由 3 种功能上连续作用的蛋白激酶组成: MAPK 激酶激酶(MAPKKK 或 MEKK)、MAPK 激酶(MAPKK、MEK 或 MKK)和 MAPK。MAPKKK 通常作用于 MKK 的 S/T-xxxxx-S/T 位点将其磷酸化并激活,随后活化的 MKK 磷酸化 MAPK 的苏氨酸和酪氨酸残基(TXY)从而激活 MAPK^[5-7]。此外,支架蛋白、共享对接域和适配器或锚定蛋白也可以介导特定 MAPK 级联的形成和完整性^[8-10]。

目前,在已报道的所有植物 MAPK 级联组分中, MKK 基因家族包含最少的成员,几乎是 MAPKs 的一半,可能激活不止一个 MAPK 蛋白;同时又远少于 MAPKKK 基因家族的成员数量,可能同一个 MKK 可以被不同的 MAPKKK 激活,这表明有大量

的 MAPKKK-MAPKK-MAPK 组合可能形成特定的 MAPK 级联^[11]。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)全基因组中有 10 个 MKK 成员,根据 S/T-xxxxx-S/T 保守基序的进化可分为 4 个亚族(Groups A-D):MKK1/2/6 属于 Group A; MKK3 属于 Group B; MKK4/5 属于 Group C; MKK7/8/9/10 属于 Group D^[12]。但近期有研究表明,通过对多个植物物种中 MKK 基因家族的进化分析,植物 MKK 基因家族成员可被分为 5 个亚家族,分别为 Group A (MKK1/2/6)、Group B (MKK3)、Group C (MKK4/5)、Group D (MKK7/8/9) 和 Group E (MKK10)^[13]。

MAPK 级联中的 MKK 组分在植物生长发育和响应外界胁迫过程中起着承上启下的作用^[5,14]。目前,已有大量研究报道对一些植物中 MKK 的功能进行了详细阐明。例如,在模式植物拟南芥中,MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 级联响应冷和盐胁迫,并介导先天的免疫应答反应^[15~18]。AtMKK1 可作用于 AtMPK6,参与 H₂O₂ 的代谢^[19]。AtMKK6 可激活突变酵母中的 AtMPK13,从而恢复细胞溶菌作用表型,且二者在拟南芥的多个组织中共表达^[20]。AtMKKK18-AtMKK3-AtMPK1/2/7 是一条脱落酸(abscisic acid, ABA)依赖的信号通路,调节叶片衰老和干旱胁迫抗性^[21]。AtMKK3-AtMPK6 在茉莉酸(jasmonic acid, JA)介导的信号转导途径^[22]和蓝光介导的信号转导途径^[23]中起着关键作用。过表达 AtMKK7 导致拟南芥生长素极性运输缺陷和异常表型^[24]。AtMKK9 的缺失会造成植物对高盐极度敏感,据报道, MKK9-MPK3/MPK6 级联一方面可以调控磷酸盐的吸收^[25],另一方面参与乙烯信号转导通路^[26,27]。在烟草(*Nicotiana tabacum*)中, NPK1-NQK1/NtMEK1-NRK1 级联(一个 MAPK 级联,其中 NQK1/NtMEK1 是烟草 NtMKK6 的同源基因)参与了细胞分裂后期细胞板的形成^[28]。ZmMKK4 过表达可以提高拟南芥对盐胁迫和冷胁迫的耐受性^[29]。在拟南芥中,过表达 ZmMKK1 和 GhMKK1 都可以调节抗氧化酶和 ABA 相关基因的表达,从而增强植物对高盐和干旱胁迫的耐受性;另外,酵母双杂交实验显示, ZmMKK1 与 ZmMEKK1 互作^[30,31]。GhMKK3-GhMPK7 是一条 ABA 或干旱胁迫诱导的信号通路, GhMKK3 在响应干旱胁迫的过程中主要是通过调节气孔关闭和根毛生长的方式^[32]。大豆(*Glycine max*)

中的 GmMEKK1-GmMKK1/2/4/9-GmMPK3/6 级联调节细胞死亡并参与免疫防御反应^[33]。Kiegerl 等^[34]发现 SIMKK 介导的 SIMK 激活使苜蓿(*Medicago sativa*)积极响应盐胁迫。苹果(*Malus domestica*)中的 MdMKK1-MdMPK1 在种子萌发和幼苗生长中对 ABA 超敏感^[35]。水稻(*Oryza sativa*)中的 OsMKK6-OsMPK3 级联在冷胁迫信号通路中扮演重要角色,增强植物的寒冷抗性^[36]。OsMKKK10-OsMKK4-OsMAPK6 级联参与水稻的籽粒发育,调控籽粒大小和重量^[37]。

大量研究表明, MKK 基因家族已经在多种植物中得到系统鉴定和分析。十字花科鼠耳芥属植物小鼠耳芥(*Arabidopsis pumila*),俗称小拟南芥,是生长在新疆半干旱、半盐碱化的特殊环境下的一种短命植物^[38],具有耐盐碱、抗干旱、光合能力强、生长周期短及繁殖率高等特点,是研究植物抗逆性的优良材料^[39,40]。然而,目前对小拟南芥 MKK 基因家族尚未进行系统的研究。利用本实验室前期获得的小拟南芥基因组测序数据(数据未公布),本研究对小拟南芥中 MKK 基因家族的成员进行了全基因组搜索和鉴定,详细介绍了小拟南芥 MKK 基因家族成员的染色体定位、模式植物拟南芥与小拟南芥 MKK 基因家族成员的多重序列比对、motif 分布、外显子-内含子结构以及启动子区的顺式作用元件分布情况。此外,本研究还比较了小拟南芥、水稻和小拟南芥的近缘物种 MKK 基因家族的系统发育关系。Ka/Ks、Tajima 相对速率测验和共线性分析表明,小拟南芥 MKK 基因家族中存在基因复制和加速进化事件。最后,利用 RNA-seq 数据,对小拟南芥 MKK 基因在不同组织和盐胁迫不同时间点的表达模式进行研究,初步分析了 ApMKK 基因的功能,为后续解析 MAPK 级联参与小拟南芥生长发育和响应逆境胁迫的机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究对象是新疆短命植物小拟南芥。首先将小拟南芥种子杀菌消毒处理后播撒在 1/2 MS 培养基平板上,于 4℃ 冰箱春化 2~3 d,然后置于 22℃ 光照

培养箱中(16 h 光照, 8 h 黑暗), 待长出 2~3 片真叶后, 将幼苗移栽至含有营养土和蛭石(体积比为 1:1)的盆钵中, 放置在光照培养间里(16 h 光照, 8 h 黑暗)培养^[38]。

本实验室前期完成了小拟南芥不同组织(茎、叶、花和果荚)转录组测序, 方法如下: 收集 3 个月大的小拟南芥不同组织(茎、叶、花和果荚), 每个组织样品的收集都是选取长势相似的 3 株小拟南芥植株作为 3 个生物学重复, 然后进行混合。小拟南芥盐胁迫转录组测序数据来自本实验室前期研究成果^[40], 具体方法: 选取生长 6 周的小拟南芥幼苗, 用含 250 mmol/L NaCl 的改良 Hoagland 营养液通过水培法进行盐胁迫, 在胁迫处理 0.5 h、3 h、6 h、12 h、24 h 和 48 h 后收集叶片, 用于转录组测序。未处理的小拟南芥叶片用作 0 h 对照。

1.2 小拟南芥 MKK 基因家族成员的鉴定及命名

利用小拟南芥基因组的蛋白序列文件, 通过本地 BLAST 工具 BioEdit (version 7.2.5) 创建一个拟南芥的蛋白序列数据库。分别从 TAIR 网站(<https://www.arabidopsis.org/>)和 RGAP 网站(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)下载拟南芥和水稻 MKK 氨基酸序列作为诱饵序列, 在小拟南芥蛋白数据库(未公布)中进行 BLASTP 比对, 搜索得到 $E\text{-value} \leq 1e-10$ ^[41] 的序列, 将这些序列整合在一起删去重复序列, 然后将候选的小拟南芥 MKK 氨基酸序列提交到 Pfam-Scan (<http://pfam.xfam.org/>), 以评估是否具有特有的 MKK 保守结构域-蛋白激酶结构域, 从而确定最终的候选基因。使用 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>)蛋白质组学服务器估算预测的 ApMKKs 蛋白的分子量和等电点。ApMKKs 亚细胞定位通过 ProtComp 9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>)进行预测。

小拟南芥中每个 MKK 基因的名称都以小拟南芥拉丁名 *Arabidopsis pumila* 的缩写 Ap 开头, 然后是小拟南芥 MKK 基因在模式植物拟南芥中对应的直系同源基因的名称, 如 ApMKK1。拟南芥 MKK 基因家族的大部分成员在小拟南芥中具有两个直系同源基因(ortholog), 少部分只有 1 个, 极少数无直系同源基因。最终, 本研究采取将小拟南芥中的旁系同源基因(paralog)按连续编号的方式进行命名(如

ApMKK1-1 和 ApMKK1-2)。对于只有一个同源基因的情况, 如 AtMKK6, 在小拟南芥中只有一个直系同源基因, 将其编号为 ApMKK6-1^[42]。

1.3 系统进化树构建、motif 分布和多重序列比对

分别从 TAIR 网站和 RGAP 网站下载拟南芥和水稻 MKK 基因家族成员的氨基酸序列。从 Ensembl 基因组数据库(<http://plants.ensembl.org/index.html>)下载小拟南芥近缘物种琴叶拟南芥(*Arabidopsis lyrata*)、盐芥(*Eutrema salsugineum*)和叶芽鼠耳芥(*Arabidopsis halleri*)的基因组数据, 然后对这 3 个近缘种的 MKK 基因家族进行鉴定, 获取对应的 MKK 氨基酸序列。利用水稻、拟南芥、琴叶拟南芥、盐芥、叶芽鼠耳芥和小拟南芥的 MKK 氨基酸序列, 通过 MEGA6.0^[43]软件的邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树(邻接树的支持率以自展(bootstrap)法获得, 重复取样 1000 次^[44]), 分析 MKK 基因家族的进化关系。参照文献^[45]设置参数和进化树格式, 利用最大似然法(maximum likelihood, ML) (Bootstrap=1000)和邻接法构建小拟南芥和拟南芥 MKK 基因家族进化树。ApMKK 蛋白质的保守 motif 使用 MEME 网站(<http://meme-suite.org/tools/meme>)进行分析, motif 长度范围为 10~50 个氨基酸残基, motif 最大发现数目为 12 个, 其他参数设为默认值。利用 BioEdit (version 7.2.5) 软件进行多重氨基酸序列比对, 参数为默认值。

1.4 基因结构、复制事件和共线性分析

基于每个 ApMKK 基因的开放阅读框(open reading frame, ORF)和基因组编码区的比较, 借助基因结构显示服务器 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)分析 ApMKK 基因的外显子-内含子分布。

基因复制事件通过多重序列比对和共线性分析来揭示。另外, ApMKK 旁系同源基因的确定需满足两个条件: 比对长度大于较长基因的 90%; 核苷酸一致性>90%的情况下才被视为复制基因^[46,47]。借助 ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)计算成对基因的蛋白编码区序列(coding sequence, CDS)相似性和蛋白相似性, 参数选为默认值。使用 DnaSP 6.0 软件^[48]计算非同义替换率(K_a)和同义替

换率(K_s),通过 *ApMKK* 旁系同源基因间的 K_a/K_s 来评估进化过程中复制基因的选择压力(提交序列为 CDS 序列,编码区域设置为从序列的起始到终止)。 $K_a/K_s > 1$ 、 < 1 或 $= 1$ 分别表示正、负或中性演化^[49]。获取 *ApMKK* 复制基因对的氨基酸序列,利用 MEGA6.0 软件进行 Tajima 相对速率测验,从而确定 *ApMKK* 复制基因在复制事件发生后的进化速率(提交序列为全长氨基酸序列,设定 Taxon A 序列, Taxon B 序列和 outgroup 序列对应的基因名,其他参数默认)。本研究对于复制基因发生加速进化的判断根据: Tajima 相对速率(P 值)是否小于 0.05,若复制基因对的 P 值 < 0.05 ,则表明复制基因发生了加速进化^[50]。使用 Circos 程序^[51]分析小拟南芥、拟南芥和叶芽鼠耳芥中 *MKK* 同源基因的共线关系。

1.5 小拟南芥 MKK 基因表达模式分析

利用本实验室前期获得的组织转录组数据获取小拟南芥 *ApMKK* 基因在不同组织(成熟期的茎、叶、花和果荚)中的 RPKM 值,然后借助 R 语言的热图程序包将表达数据(RPKM 的 \log_2 值)可视化为热图,进而分析 *ApMKK* 基因在小拟南芥不同组织中的表达情况。从盐胁迫转录组数据^[40]中获取小拟南芥 *ApMKK* 基因在盐胁迫不同时间点(0 h、0.5 h、3 h、6 h、12 h、24 h 和 48 h)的 FPKM 值,同样借助 R 语言中的热图程序包将表达数据(FPKM 的 \log_2 值)可视化为热图,然后分析 *ApMKK* 基因在盐胁迫不同时间点的表达情况。

1.6 小拟南芥 MKK 基因启动子区的顺式作用元件分布

检索小拟南芥基因组数据库,截取每个 *ApMKK* 基因起始密码子上游的 1500 bp 区域作为启动子序列,然后将这些序列提交至 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>),以预测 *ApMKK* 启动子区的顺式作用元件。

2 结果与分析

2.1 小拟南芥 MKK 基因家族成员的鉴定

将拟南芥 *MKK* (*AtMKK*)氨基酸序列作为蛋白

种子序列,在小拟南芥基因组数据库中进行蛋白序列检索,去除重复序列后结合 Pfam 分析,最终确定小拟南芥 *MKK* 基因家族有 16 个成员,它们都具有蛋白激酶域,具体信息见表 1。另外,16 个 *ApMKKs* 的 ORF 长度从 939 bp (*ApMKK9-1* 和 *ApMKK9-2*)到 1692 bp (*ApMKK3-1*)不等,其编码蛋白由 312~367 个氨基酸组成,蛋白质分子量为 34.53~62.75 kDa,等电点为 5.715~9.268。预测显示,除了 *ApMKK7-1* 定位于膜结合线粒体外,其他 *ApMKKs* 的亚细胞定位均显示位于细胞质中。

2.2 小拟南芥 MKK 多重序列比对和 motif 分布

为了更好地解析小拟南芥和拟南芥 *MKK* 蛋白的序列保守性,本研究进行了多重序列比对和保守 motif 分析。多重序列比对结果表明,鉴定获得的 16 个 *ApMKKs* 基本包含已报道过的活性位点 D (L/I/V) K^[52,53]、S/T-xxxxx-S/T^[54]和 VGE_{xx}YMSPER^[12](图 1)。根据拟南芥 *AtMKK* 的最新分组情况^[13],*ApMKK1-1/1-2/2-1/2-2/6-1* 属于 Group A; *ApMKK3-1/3-2* 属于 Group B; *ApMKK4-1/4-2/5-1/5-2* 属于 Group C; *ApMKK7-1/9-1/9-2* 属于 Group D; *ApMKK10-1/10-2* 属于 Group E。特别注意的是,Group E 中的 *AtMKK10*、*ApMKK10-1* 和 *ApMKK10-2* 无 S/T-xxxxx-S/T 保守结构域。

此外,通过 MEME 在线程序对 16 个 *ApMKKs* 进行保守 motif 分析,共预测出 11 个保守的 motifs,这 11 个保守 motifs 的分布见图 2A,详细的氨基酸序列信息见图 2B。本研究发现,所有的 *ApMKKs* 皆包含 motif 1/2/3/4/5/6/7,其中 motif 1 包含两个主要 *MKK* 保守结构域:D (L/I/V) K 和 S/T-xxxxx-S/T,这两个保守结构域在多重序列比对结果(图 1)中也得以鉴定。每个亚族都有其特有保守 motif, Group A 特有的保守 motif 是 motif 8, motif 11 是 Group C、Group D 和 Group E 所特有的。Group A 中的 *ApMKKs* 由 10 个 motifs (不含 motif 11)构成, Group B 中的 *ApMKKs* 由 8 个 motifs (不含 motif 8/10/11)构成, Group C 和 Group D 中的 *ApMKKs* 由 10 个 motifs (不含 motif 8)组成, Group E 中的 *ApMKKs* 由 9 个 motifs (不含 motif 8/9)组成,这表明相同亚族的 *MKK* 成员具有相似的 motif 组成。尽管不同亚族基因的 motif 组成不同,但它们都具有重要的活性位

表 1 小拟南芥 MKK 基因家族信息
Table 1 The information of the MKK gene family in *Arabidopsis pumila*

基因名称	基因 ID	染色体定位	ORF 长度 (bp)	蛋白信息			亚细胞定位
				氨基酸长度(aa)	分子量(kDa)	等电点(pI)	
<i>ApMKK1-2</i>	evm.model.0_8_CONTIGS_29314649.1323	Chr.1(+):6990262~6992149	1065	354	39.31	7.814	细胞质
<i>ApMKK1-1</i>	evm.model.0_8_CONTIGS_29314649.4645	Chr.1(+):23501148~23503076	1077	358	39.88	7.594	细胞质
<i>ApMKK2-1</i>	evm.model.0_8_CONTIGS_29314649.1686	Chr.1(-):8495903~8498156	1092	363	39.88	5.844	细胞质
<i>ApMKK2-2</i>	evm.model.0_8_CONTIGS_29314649.5008	Chr.1(-):24991898~24993865	1092	363	39.88	6.245	细胞质
<i>ApMKK3-2</i>	evm.model.0_8_CONTIGS_29314649.2825	Chr.1(-):13563784~13567139	1563	520	57.80	5.715	细胞质
<i>ApMKK3-1</i>	evm.model.15_12_CONTIGS_6246103.515	Chr.7(+):5444415~5452836	1692	563	62.75	6.459	细胞质
<i>ApMKK4-2</i>	evm.model.10_7_CONTIGS_16195798.2752	Chr.2(+):14582027~14583715	1104	367	40.24	9.268	细胞质
<i>ApMKK4-1</i>	evm.model.1_5_CONTIGS_22361435.3723	Chr.8(+):20665292~20666954	1101	366	40.23	9.150	细胞质
<i>ApMKK5-1</i>	evm.model.8_3_CONTIGS_16920646.1250	Chr.15(-):9291537~9293175	1059	352	38.75	8.872	细胞质
<i>ApMKK5-2</i>	evm.model.5_10_CONTIGS_17087769.190	Chr.12(+):1223643~1224707	1065	354	38.86	8.712	细胞质
<i>ApMKK6-1</i>	evm.model.12_9_CONTIGS_14700693.1144	Chr.4(+):5032874~5035053	1071	356	39.84	6.341	细胞质
<i>ApMKK7-1</i>	evm.model.1_5_CONTIGS_22361435.1675	Chr.8(+):6446682~6448053	1074	357	40.04	7.835	膜结合线粒体
<i>ApMKK9-1</i>	evm.model.11_11_CONTIGS_16209776.1528	Chr.3(+):10923089~10924475	939	312	34.54	7.840	细胞质
<i>ApMKK9-2</i>	evm.model.14_14_CONTIGS_14340626.757	Chr.6(+):2981291~2982496	939	312	34.53	7.577	细胞质
<i>ApMKK10-1</i>	evm.model.2_6_CONTIGS_19393823.773	Chr.9(-):7667156~7668097	942	313	35.07	7.895	细胞质
<i>ApMKK10-2</i>	evm.model.1_5_CONTIGS_22361435.2816	Chr.8(+):11455855~11456796	942	313	34.92	7.623	细胞质

染色体定位提供了基因所在的染色体以及染色体上的起始位置，+和-分别表示序列的方向，正义链和反义链；ORF 表示开放阅读框。

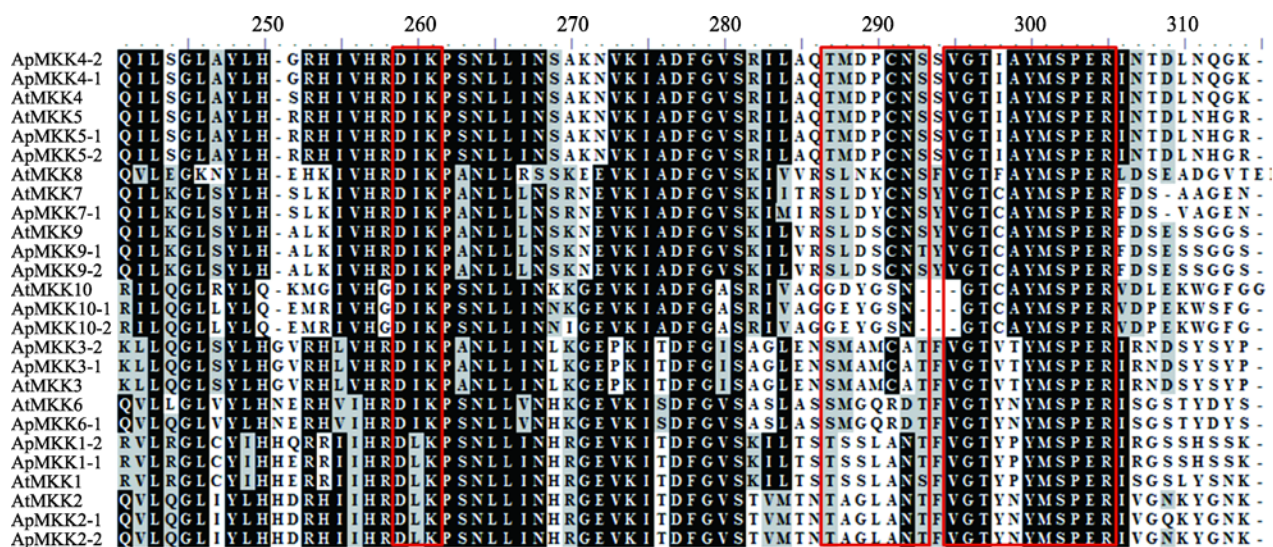


图1 小拟南芥 ApMKK 与拟南芥 AtMKK 的氨基酸多重序列比对

Fig. 1 Multiple amino acid sequence alignment of ApMKK and AtMKK proteins

阴影部分表示保守区域;红色方框分别表示 ApMKK 的 3 个主要保守结构域: D (L/I/V) K, S/T-xxxxx-S/T 和 VGExxYMSPER。

点 motif 1,且共有的 motif 以基本相同的顺序排列,但是只有 Group B 除外,Group B 中 MKK3 的 motif 2 和 motif 6 的分布顺序与其他亚族相反。令人意外的是,motif 9 是重要的催化位点(VGExxYMSPER),多重序列比对结果也显示所有 ApMKKs 都具有 MKK 重要的催化结构域 VGExxYMSPER,但 Group E 中的 ApMKK10-1 和 ApMKK10-2 却不包含 motif 9,这可能与 MEME 的 motif 识别程序有关。另外,ApMKK 和 AtMKK 基因家族之间的大部分直系同源基因的 motif 组成相同,唯独 MKK10 例外,ApMKK10-1/10-2 比 AtMKK10 多一个 motif 10。

2.3 小拟南芥 MKK 基因家族成员的进化和外显子-内含子结构

为揭示小拟南芥 ApMKK 和小拟南芥近缘物种 MKK 之间的进化关系,分别获取水稻(8 个)、拟南芥(10 个)、叶芽鼠耳芥(9 个)、琴叶拟南芥(9 个)和盐芥(10 个)MKKs 和小拟南芥的 16 个 ApMKKs 的氨基酸序列,构建系统发育树(图 3)。根据进化树信息,MKK 基因家族成员被分为 5 个亚族,分别是 Group A、Group B、Group C、Group D 和 Group E。对 6 个物种中 MKK 基因家族的各个亚族的基因个数进行统计,结果发现,小拟南芥 MKK 基因家族的成员数量明显多于其近缘物种和水稻,其中 Group B 和 Group C 的 ApMKK 基因数目是其他 5 种植物 B、

C 亚族 MKK 基因的两倍(图 4)。从进化关系来看(图 3),小拟南芥中的大部分 MKKs 两两排布在一起,似乎小拟南芥 MKK 基因家族中存在一些复制关系。为了验证小拟南芥 ApMKK 基因家族中是否存在复制基因对,通过计算进化关系很近的两个 ApMKKs 的 CDS 相似性和蛋白相似性发现,CDS 相似性大于 90% 的有 7 对基因,为此本研究鉴定到小拟南芥 MKK 基因家族有 7 对复制基因,分别是 ApMKK1-1/1-2、ApMKK2-1/2-2、ApMKK3-1/3-2、ApMKK4-1/4-2、ApMKK5-1/5-2、ApMKK9-1/9-2 和 ApMKK10-1/10-2,具体信息见表 2。而 ApMKK6-1 和 ApMKK7-1 没有旁系同源基因,即没有发生复制事件。出乎意料的是,小拟南芥中不存在 AtMKK8 的直系同源基因,可能在进化中发生了丢失。从近缘物种进化关系远近的角度来分析,盐芥与小拟南芥的亲缘关系最远,特别是 ApMKK3-1/3-2 与近缘种 MKK 的关系较远。

基因结构的差异在基因家族进化中起着重要的作用,可用于系统发育关系的评价^[55,56]。通过分析 AtMKK 和 ApMKK 的系统发育关系和外显子-内含子分布发现,所有 MKK 基因被分为 5 个亚族(Group A、Group B、Group C、Group D 和 Group E),该分类结果与图 3 相同,同时观察到相同亚族中的大多数成员具有非常相似的外显子-内含子结构(图 5),这种相似性为 MKK 家族的基因分类、拟南芥和小拟南芥 MKK 基因家族之间的进化关系提供了证据。通

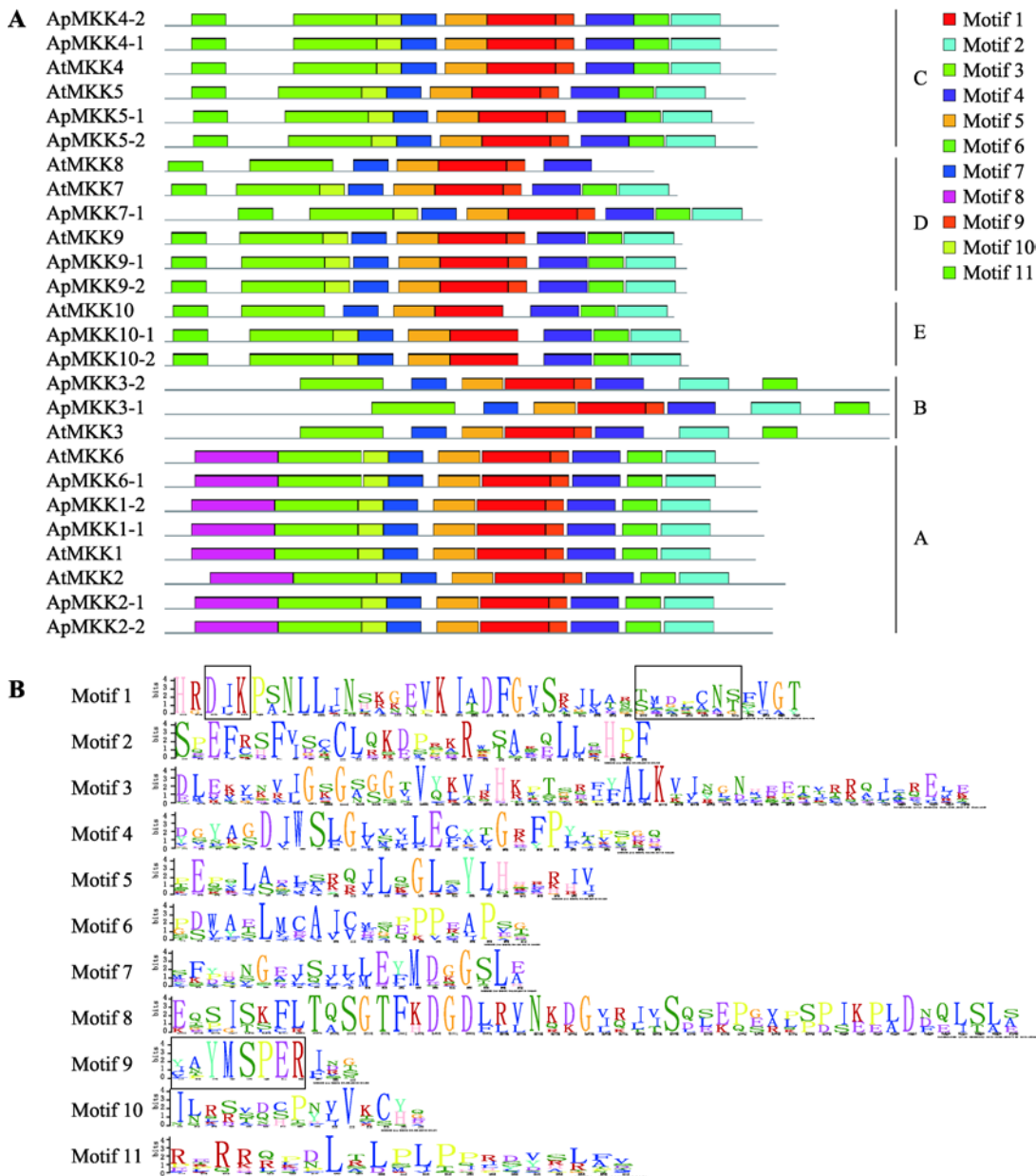


图 2 拟南芥和小拟南芥 MKK 蛋白的 motif 分析

Fig. 2 Motif analysis of the MKK proteins in *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis pumila*

A: 16 个 ApMKKs 和 10 个 AtMKKs 的 motif 分布(不同颜色的长方形代表 11 个公认的保守 motif); B: 11 个保守 motif 的详细氨基酸序列信息(每个字母的高度表示该位置氨基酸的出现的频率, 而黑色方框表示 3 个主要保守结构域的关键位置)。

过比较小拟南芥和拟南芥各亚族 MKK 基因所含的外显子个数, 发现 Group C、Group D 和 Group E 的 MKKs 皆只包含 1 个外显子; Group A 的成员包含 8 个外显子; Group B 较为特殊, 其中 AtMKK3、ApMKK3-1 和 ApMKK3-2 所包含的外显子个数分别为 8、11、9 个, 但共有的 8 个外显子的大小和分布是一致的, 这表明 ApMKK 和 AtMKK 同源基因之间

的基因结构基本是保守的。此外, 不仅在旁系同源基因中观察到类似的基因结构, 而且在直系同源基因中也观察到类似的基因结构, 这暗示小拟南芥中 MKK 复制基因对和拟南芥 MKK 基因在进化上具有相同的起源。

为了进一步研究小拟南芥 MKK 基因家族的扩张, 对小拟南芥、拟南芥和叶芽鼠耳芥的 MKK 基因

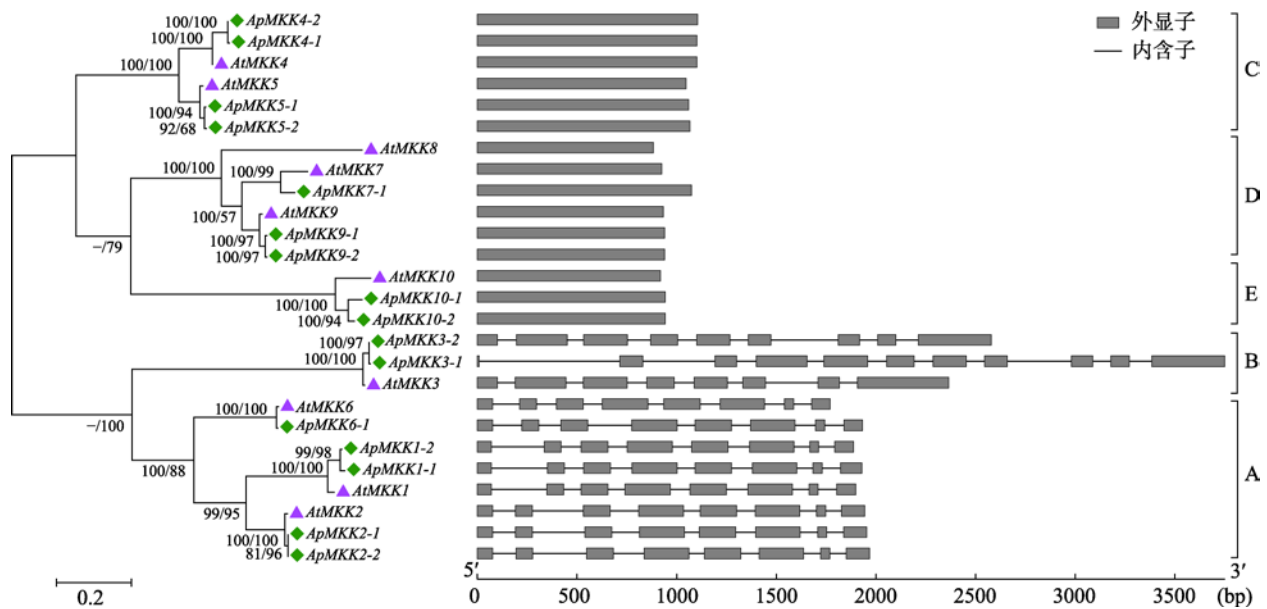


图 5 小拟南芥和拟南芥 MKK 基因家族成员的系统进化树和外显子-内含子结构示意图

Fig. 5 Phylogenetic tree and exon-intron structures of the MKK gene family in *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis pumila*

借助 MEGA6.0 构建小拟南芥和拟南芥 MKK 基因的最大似然树(左图), 分支上的数字表示各个分支的支持率(邻接法/最大似然法); 利用 GSDS 软件分析小拟南芥 MKK 基因的外显子-内含子分布(右图)。

复制基因对(*ApMKK1-1/1-2* 和 *ApMKK2-1/2-2*), 可能存在串联重复。

进化选择的模式可以通过 Ka/Ks 来估算, $Ka/Ks > 1$ 表示正选择, $Ka/Ks < 1$ 表示纯化选择, $Ka/Ks = 1$ 表示中性选择^[49]。7 个 *ApMKK* 复制基因对的 Ka/Ks 皆小于 1, 表明它们都经过了纯化选择(表 3)。本研究进一步对 MKK 基因家族中的复制基因对进行 Tajima 相对速率测验, 以评估复制事件发生后 *ApMKK* 复制基因是否加速进化。结果发现, 复制基因对 *ApMKK1-1/1-2* 之间的进化速率($P < 0.05$)发生了统计学意义上的增加, 表明这两个复制基因可能存在潜在的功能差异(表 4)。

2.4 小拟南芥 MKK 基因在不同组织中的表达分析

为了深入了解 16 个 *ApMKK* 基因在不同组织中的表达模式, 通过 R 语言分析工具, 利用本实验室前期获得的组织转录组数据, 将 *ApMKK* 基因的表达模式可视化热图, 结果发现小拟南芥 16 个 *ApMKK* 基因在不同组织中皆差异表达且具有组织表达特异性(图 7)。4 个组织中都有 Group A 和 Group

B 的 *ApMKK* 参与表达; Group C 和 Group D 中 *ApMKK* 的表达模式较为特别, 仅在茎和叶中高表达; Group E 的 MKK 成员在花和果荚中的表达量较高。另外, *ApMKK* 复制基因的表达模式并非全部一致, 较为明显的如 *ApMKK2-1* 在茎和花中高表达而 *ApMKK2-2* 在叶中高表达, *ApMKK3-2* 在叶中高表达而 *ApMKK3-1* 在花中高表达。结果表明, *ApMKK* 既保持了固有的功能保守性, 也存在功能分歧, 预示小拟南芥可能存在功能进化上的保守性和多样性。

2.5 小拟南芥 MKK 基因在盐胁迫下的表达分析

通过分析小拟南芥在盐胁迫不同时间点的转录组数据^[40]发现, 小拟南芥 *ApMKK* 基因家族的 16 个成员中有 14 个 *ApMKK* 基因差异表达, 而 Group E 的 *ApMKK10-1* 和 *ApMKK10-2* 在盐胁迫各时间点皆不表达。为了深入了解差异表达的 14 个 *ApMAPK* 基因在 250 mmol/L NaCl 胁迫不同时间点的表达模式, 本研究通过 R 语言分析工具, 利用盐胁迫转录组数据的 FPKM 值, 将 *ApMKK* 基因的表达模式可视化热图。结果显示, Group B 和 Group D 的所有差异表达基因在盐胁迫处理后皆呈现表达下调的

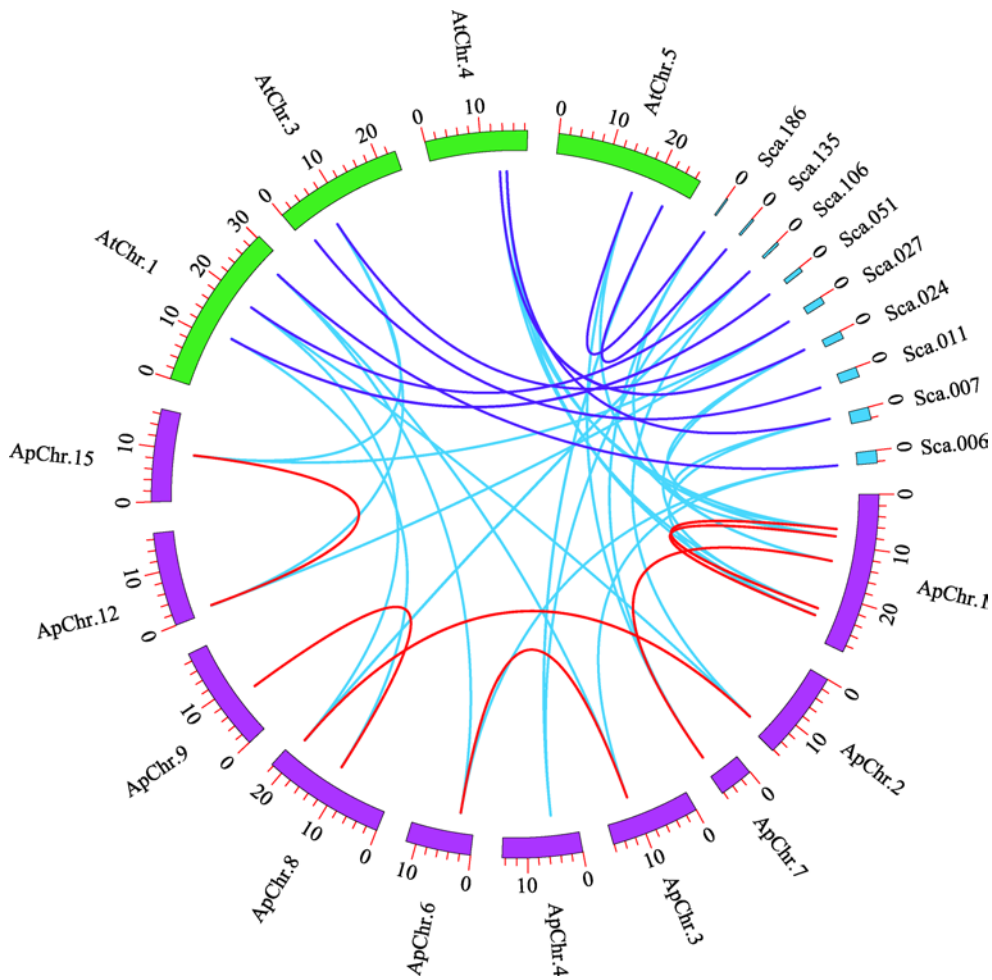


图 6 拟南芥、叶芽鼠耳芥和小拟南芥中 *MKK* 基因的共线关系

Fig. 6 Syntenic analysis of *MKK* genes in *Arabidopsis halleri*, *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis pumila*

不同颜色的圆弧代表不同物种的染色体和 scaffolds, 曲线末端指向 *MKK* 基因在染色体上的位置。红色曲线代表小拟南芥染色体上分布的 *MKK* 复制基因对, 按顺时针方向依次是 ApChr.1: *ApMKK1-2*、*ApMKK2-1*、*ApMKK3-2*、*ApMKK1-1*、*ApMKK2-2*; ApChr.2: *ApMKK4-2*; ApChr.7: *ApMKK3-1*; ApChr.3: *ApMKK9-1*; ApChr.4: *ApMKK6-1*; ApChr.6: *ApMKK9-2*; ApChr.8: *ApMKK10-2*、*ApMKK4-1*; ApChr.9: *ApMKK10-1*; ApChr.12: *ApMKK5-2*; ApChr.15: *ApMKK5-1*。小拟南芥中的 *MKK* 复制基因对由红线连接; 拟南芥与其他两种植物的同源基因以蓝色曲线连接; 紫色曲线连接拟南芥和叶芽鼠耳芥之间的同源基因对。

表 3 小拟南芥 *MKK* 复制基因对的 *Ka/Ks* 比率

Table 3 The *Ka/Ks* ratios of duplicated *MKK* genes in *Arabidopsis pumila*

复制基因对	<i>Ka</i>	<i>Ks</i>	<i>Ka/Ks</i>	进化选择模式
<i>ApMKK4-2</i> / <i>ApMKK4-1</i>	0.0036	0.0755	0.0478	纯化选择
<i>ApMKK5-1</i> / <i>ApMKK5-2</i>	0.0075	0.0787	0.0955	纯化选择
<i>ApMKK3-2</i> / <i>ApMKK3-1</i>	0.0058	0.0735	0.0795	纯化选择
<i>ApMKK1-2</i> / <i>ApMKK1-1</i>	0.0123	0.0828	0.1485	纯化选择
<i>ApMKK2-1</i> / <i>ApMKK2-2</i>	0.0084	0.1060	0.0794	纯化选择
<i>ApMKK10-1</i> / <i>ApMKK10-2</i>	0.0228	0.0992	0.2298	纯化选择
<i>ApMKK9-1</i> / <i>ApMKK9-2</i>	0.0042	0.1434	0.0294	纯化选择

Ka: 非同义替换率; *Ks*: 同义替换率。

表 4 小拟南芥 *MKK* 复制基因对的 Tajima 相对速率测验
Table 4 Tajima relative rate tests of *MKK* gene pairs in *Arabidopsis pumila*

测试组	Mt	M1	M2	χ^2	<i>P</i>
<i>ApMKK4-1</i> / <i>ApMKK4-2</i> - <i>AtMKK4</i>	347	1	2	0.33	0.56370
<i>ApMKK5-1</i> / <i>ApMKK5-2</i> - <i>AtMKK5</i>	335	3	1	1.00	0.31731
<i>ApMKK3-1</i> / <i>ApMKK3-2</i> - <i>AtMKK3</i>	493	5	2	1.29	0.25684
<i>ApMKK1-1</i> / <i>ApMKK1-2</i> - <i>AtMKK1</i>	325	7	1	4.50	0.03389
<i>ApMKK2-1</i> / <i>ApMKK2-1</i> - <i>AtMKK2</i>	352	3	2	0.20	0.65472
<i>ApMKK9-1</i> / <i>ApMKK9-2</i> - <i>AtMKK9</i>	295	2	1	0.33	0.56370
<i>ApMKK10-1</i> / <i>ApMKK10-1</i> - <i>AtMKK10</i>	253	9	4	1.92	0.16552

Tajima 相对速率测试用于检验小拟南芥旁系同源物之间进化速率的相等性; Mt 是 3 个测试序列中相同位点的总和; M1 是复制基因对第 1 个基因中特异差异位点的数量; M2 是复制基因对第 2 个基因中特异差异位点的数量; 如果 $P < 0.05$, 则测试拒绝两个重复样本之间的相等替换率, 并推断两个重复基因之一具有加快的进化速率。

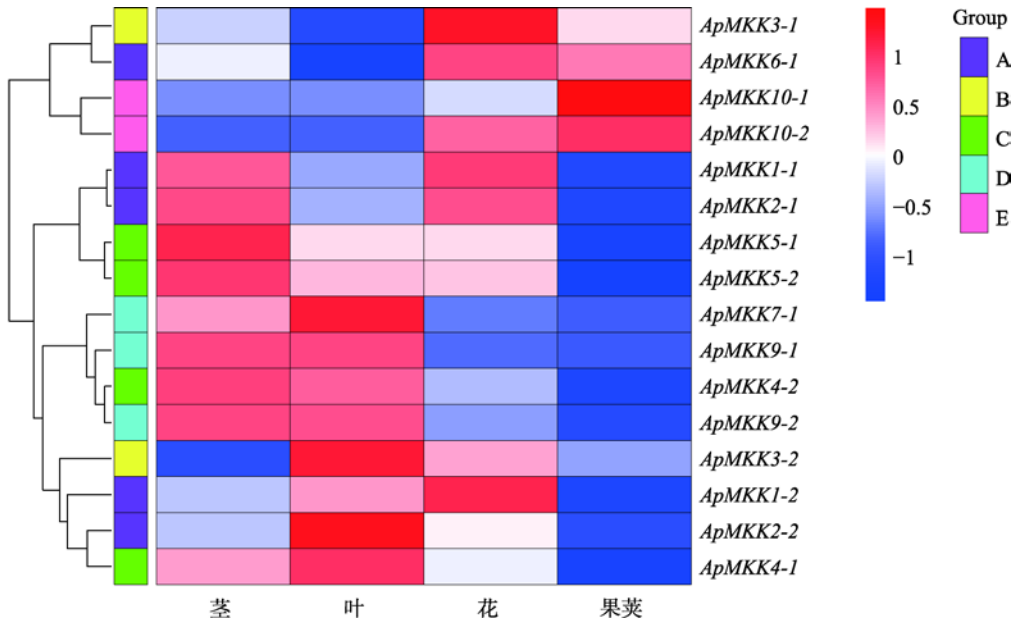


图 7 *ApMKK* 基因在不同组织中的表达图谱
Fig. 7 Tissue expression profiles of *ApMKK* genes

右上角的色度条显示了所有 *ApMKKs* 在不同组织中的表达量(RPKM 的 log₂ 值)变化范围。红色越深, 表达量越高; 蓝色越深, 表达量越低。

趋势, 而 Group C 的所有基因总体上表现为上调表达, 较为特殊的是, Group A 的部分成员(*ApMAPK1-1* 和 *ApMAPK1-2*)上调表达, 部分基因(*ApMAPK6-1*、*ApMAPK2-1* 和 *ApMAPK2-2*)表达下调, 呈现多样的表达模式(图 8)。这意味着各亚族 *ApMKK* 基因在盐胁迫下具有特异的表达模式。另外, 本研究还发现, *ApMKK* 复制基因在盐胁迫不同时间点的表达模式几乎相同, 这表明 *ApMKK* 复制基因具有一定的功能保守性。

2.6 小拟南芥 *MKK* 基因启动子区的顺式作用元件分析

为了解析小拟南芥 *MKK* 基因家族成员的调控模式, 本研究进一步分析了 *ApMKK* 基因启动子区域的顺式作用元件分布(图 9)。结果发现, *ApMKK* 基因家族成员的启动子区除了核心元件外, 还包括胁迫和激素响应相关元件, 这表明 *ApMKK* 基因可能响应多种外界胁迫, 即具有功能多样性。另外本

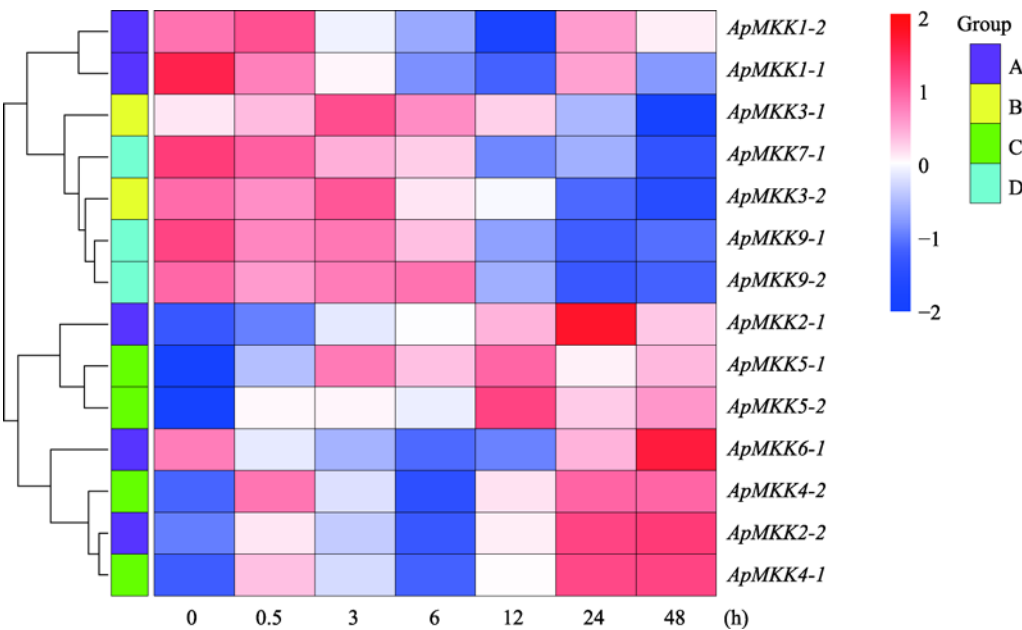


图 8 *ApMKK* 基因在盐胁迫不同时间点的表达图谱

Fig. 8 Expression profiles of *ApMKK* genes at different time points under salt stress for *Arabidopsis pumila*

右上角的色度条显示了所有 *ApMKKs* 在盐胁迫不同时间点的表达量(FPKM 的 \log_2 值)变化范围。红色越深, 表达量越高; 蓝色越深, 表达量越低。

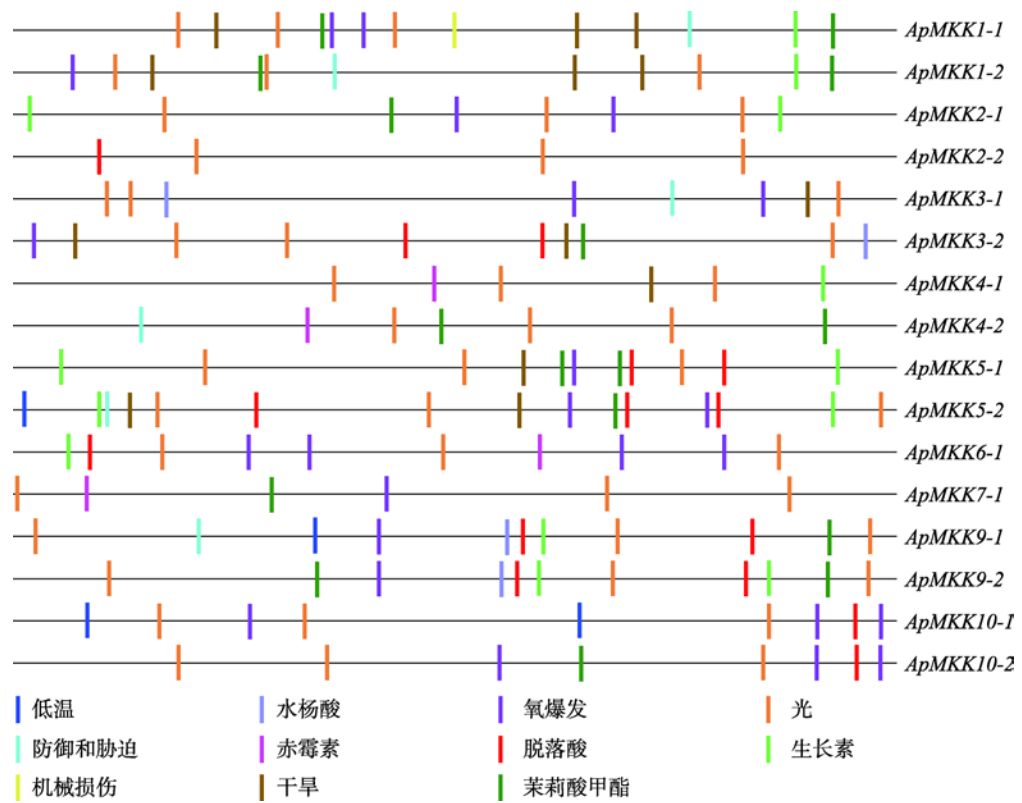


图 9 *ApMKKs* 启动子区的顺式作用元件分布

Fig. 9 Distribution of cis-elements in the promoter region of *ApMKK* genes

研究还观察到,各亚族内大部分复制基因启动子区的顺式作用元件种类不同。复制基因顺式元件种类的差异包含两种情况:一种情况是同源基因 A 的顺式元件种类包含同源基因 B 的顺式元件种类(*ApMKK1-1/1-2*、*ApMKK5-1/5-2* 和 *ApMKK9-1/9-2*),另一种情况是同源基因 A 和 B 除了具有共同的顺式元件,还有各自独特的顺式元件(*ApMKK2-1/2-2*、*ApMKK3-1/3-2*、*ApMKK4-1/4-2* 和 *ApMKK10-1/10-2*)。以上结果表明,这些旁系同源基因(复制基因对)可能存在不同的调控模式和潜在的进化命运。

3 讨论

随着一系列植物基因组测序的完成,许多植物中的 MAPK 级联成员被注释,而且陆续开展了 MAPK 级联通路 3 个基因家族的全基因组鉴定和功能分析。MAPK 级联蛋白最初在模式植物拟南芥中发现,拟南芥中 MAPKKK、MAPKK 和 MAPK 基因家族分别包含 80、10、20 个成员^[12]。截止目前,对 MAPK 级联的功能,特别是作为 MAPK 级联中间节点的 MKK 的认识还比较有限。除拟南芥外,目前对于 MKK 基因家族研究比较深入的还有棉花(*Gossypium hirsutum*) (11)^[7]、油菜(*Brassica napus*)^[53]、黄瓜(*Cucumis sativus*)^[54]、大麦(*Hordeum vulgare*)^[57]、番茄(*Solanum lycopersicum*)^[58]、苹果^[59]、玉米(*Zea mays*)^[60]、二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)^[61] 和水稻^[62]等,这些植物分别包含 11、7、6、6、5、9、8、12、8 个 MKK 基因成员。本研究从小拟南芥基因组中共鉴定出 16 个 *ApMKK* 基因,数量明显多于其他众多植物中的 MKK 基因,而且小拟南芥中 Group A、B、C、D、E 各亚族的 *ApMKK* 基因个数皆多于近缘物种,其中 Group B、C 亚族的 *ApMKK* 基因数量是近缘物种的两倍。这表明小拟南芥的 MKK 基因家族发生了明显的扩张。

本文从小拟南芥中鉴定出 7 对复制基因,从 *Ka/Ks* 分析结果来看,这些复制基因都经历了纯化选择。研究表明,植物 MKK 基因家族的 Group B、C、D、E 四个亚族的 MKK 基因在大多数植物中是单拷贝或低拷贝,而 Group A 的 MKK 基因却发生多次复制事件,产生多拷贝基因^[13]。但本文研究发现,小拟南芥各亚族的 MKK 都存在多拷贝基因,该结果

与之前的报道不相符,可能是小拟南芥发生了大范围的全基因组复制事件(whole genome duplications, WGD)。根据 Hoffmann 等^[63]研究结果,结合本实验室前期开展的全基因组测序和组装分析表明,小拟南芥是二倍体植物($2n=32$);小拟南芥和近缘物种的系统进化分析发现,小拟南芥近期发生过一次染色体复制事件(数据未公开)。因此,小拟南芥 MKK 基因家族中复制基因的出现可能是小拟南芥发生基因组扩张形成的。

基因复制是进化过程中产生新基因的基本来源,为基因的成功进化提供了新的机会,而全基因组复制是进化的一个重要特征^[64]。MKK 基因家族在生长发育和响应逆境胁迫过程中发挥重要作用。在 MKK 基因家族成员数量方面,拟南芥、小拟南芥和琴叶拟南芥中分别有 10、16、9 个 MKK 基因,即小拟南芥中 MKK 基因的数目是琴叶拟南芥中的 1.78 倍,琴叶拟南芥中 MKK 基因的数目是拟南芥中的 0.9 倍,小拟南芥中 MKK 基因的数目是拟南芥中的 1.6 倍。小拟南芥的基因组约 283 Mb (数据未公开),大约是琴叶拟南芥基因组(207 Mb)^[65] 的 1.37 倍,而琴叶拟南芥的基因组大约是拟南芥(125 Mb)^[45] 的 1.66 倍,小拟南芥的基因组大约是拟南芥基因组的 2.26 倍。这 3 个物种中 MKK 基因的数目与基因组的大小不成正比,推测可能由于进化过程中环境的改变导致小拟南芥中发生了全基因组复制或特定基因家族的扩张^[66]。须弥芥(*Crucihimalaya himalaica*)是生长在青藏高原上一种特殊环境植物,比较基因组分析发现须弥芥基因组中抗病相关的基因家族发生了明显缩减,可能与青藏高原病原菌较少有关;另外,须弥芥中抗紫外线等的基因家族发生了扩张^[67]。大多数植物中至少发生过一次 WGD,然而在拟南芥中至少发生了两次 WGDs:大约在 60~70 百万年前和 23~43 百万年前^[68,69]。WGD 的扩增结果是全基因组扩增到两倍^[64,68]。自从 WGD 事件以来,植物在漫长的进化过程中会重新移除冗余基因拷贝(如 *AtMKK6* 和 *AtMKK7* 在小拟南芥中分别只有一个直系同源基因),但也会保留一些重复的拷贝,这取决于它们对环境的适应,这也是植物物种间特定基因家族成员数量存在差异的原因^[68,70]。出人意料的是,小拟南芥中没有 *AtMKK8* 的同源基因,可能在进化过程中发生了选择性丢失。

分析小拟南芥和拟南芥 MKK 基因家族成员的 motif 分布和外显子-内含子结构发现,小拟南芥 MKK 基因家族的各亚族成员都具有其特有的 motif 组成和基因结构,即相同亚族的成员具有相似的 motif 组成和基因结构。另外,ApMKK 基因家族和 AtMKK 基因家族的大部分直系同源基因的 motif 组成和外显子-内含子也相似。旁系同源基因和直系同源基因中类似的基因结构,暗示了小拟南芥和拟南芥中的 MKK 基因在进化上具有相同的起源。然而 Group B 中 AtMKK3、ApMKK3-1 和 ApMKK3-2 的外显子个数不尽相同,分别包含 8、11、9 个外显子(共有的 8 个外显子的大小和分布是一致的),而且 Group B 成员的 motif 2 和 motif 6 的分布顺序与其它亚族 MKK 不同。除 ApMKK3-1/3-2 与 AtMKK3 的基因结构不同外,ApMKK3-1 和 ApMKK3-2 之间的基因结构也存在一定差异。这表明小拟南芥 Group B 中 MKKs 的基因结构和 motif 分布发生了大的分歧,也预示 Group B 的 MKK 基因在功能进化上的多样性。ApMKK3-1 和 ApMKK3-1 的组织表达模式差异正好印证了这一点。值得注意的是,Group E 中 ApMKK10-1/10-2 和 AtMKK10 的 S/T-xxxxx-S/T 保守区都发生了突变。目前,关于 MKK8 和 MKK10 的功能信息较少,可能是由于它们的转录水平较低,或是因为 MKK10 活性位点的突变而没有发挥生物学功能^[61]。本研究通过分析 ApMKK 基因在不同组织和盐胁迫下的表达情况表明,ApMKK10-1 和 ApMKK10-2 在小拟南芥果荚中高表达,但在盐胁迫不同时间点都未检测到二者的表达,这与之前报道的结果相符。然而也有报道显示,OsMKK10-2 在水杨酸(salicylic acid, SA)信号介导的防御机制中起关键作用^[71],这可能与不同物种的进化差异有关。

ApMKK 基因参与了小拟南芥不同组织的发育,皆显示出组织表达特异性。本研究发现,ApMKK1-1/1-2、ApMKK3-1、ApMKK6-1 与它们的直系同源基因 AtMKK1、AtMKK3 和 AtMKK6 皆在花中高表达^[61];另外,小拟南芥中的部分旁系同源基因的表达模式相同,如 ApMKK4-1/4-2 和 ApMKK9-1/9-2 在茎和叶中表达水平较高,ApMKK5-1/5-2 在茎中高表达。这些发现表明,MKK 旁系同源基因间和直系同源基因间皆存在一定的功能保守性。与此同时,ApMKK4-1/4-2 在茎和叶中的表达水平较高,而它们的直系同源

基因 AtMKK4 在花和果荚中有较高的表达量^[61],这表明直系同源基因间也存在功能分歧。值得关注的是,小拟南芥 MKK 复制基因对的表达模式。基因复制是提高植物对新环境适应性的主要驱动因素,其引起的功能多样性可能导致基因表达水平和蛋白质性质的改变。本研究发现,部分旁系同源基因的表达模式存在很大差异,如 ApMKK2-1 在茎和花中高表达而 ApMKK2-2 在叶中高表达,ApMKK3-2 在叶中高表达而 ApMKK3-1 在花中高表达,表明这些复制基因可能在不同的信号转导途径中发挥作用或者一些复制基因在进化过程中获得新的功能^[53]。分析 Tajima 相对速率结果发现,小拟南芥中的一对复制基因 ApMKK1-1/1-2 在复制事件发生后,其中一个基因经历了加速进化,这预示着小拟南芥 MKK 基因的新功能化和亚功能化的产生。进而分析小拟南芥 MKK 基因组织表达热图和启动子区的顺式作用元件分布发现,ApMKK1-1 和 ApMKK1-2 的表达模式不同:ApMKK1-1 在叶和花中高表达,而 ApMKK1-2 在茎和花中高表达;且二者顺式元件的种类也有所不同:ApMKK1-1 要比 ApMKK1-2 多一类机械损伤顺式元件(wound)。以上分析表明,尽管小拟南芥 MKK 复制基因间具有高的 CDS 和氨基酸相似性,但也存在一定的功能分歧。与组织表达模式不同的是,MKK 复制基因在盐胁迫不同时间点的表达模式几乎相同,暗示着在不同的生物学过程中,小拟南芥 MKK 复制基因的表达模式组合可能存在一定差异。本文不足的地方在于小拟南芥的组织表达中没有涉及根的表达信息,后期会展开小拟南芥各生长发育时期的不同组织转录组测序,进而弥补本实验的不足。

MKK 是 MAPK 级联组分中成员最少的一个基因家族,为此同一个 MKK 或相同 MKK 级联可能响应多种逆境胁迫。MEKK1-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 级联赋予拟南芥对细菌和真菌病原体的抗性^[72]。另外有研究发现,MKK4/5-MPK3/6 负调控冷胁迫抗性^[17,73]。近期又有研究报道 MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 在生长素促进侧根形成中是不可或缺的^[74]。AtMKK5-AtMPK6 级联途径也参与 ABA 应答^[75]。小拟南芥生长在新疆干旱、高温的盐碱地环境,有大量的抗逆基因值得挖掘,而小拟南芥 MAPK 级联作为响应外界不利环境的信号转导途径,可帮助人们

进行抗逆基因的初探。本研究对 MAPK 级联中的 MKK 基因家族进行了生物信息学和表达特征分析, 后期将陆续对 MAPK 级联中另外两个基因家族展开研究, 为解析小拟南芥的抗逆机制奠定基础。

参考文献(References):

- [1] Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, 2002, 14(Suppl): S165–183. [\[DOI\]](#)
- [2] Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell*, 1993, 72(3): 427–441. [\[DOI\]](#)
- [3] Jonak C, Okrész L, Bögre L, Hirt H. Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5(5): 415–424. [\[DOI\]](#)
- [4] Yu YJ, Liang Y, Lv ML, Wu J, Lu G, Cao JS. Genome-wide identification and characterization of polygalacturonase genes in *Cucumis sativus* and *Citrullus lanatus*. *Plant Physiol Biochem*, 2014, 74: 263–275. [\[DOI\]](#)
- [5] Xu J, Zhang SQ. Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends Plant Sci*, 2015, 20(1): 56–64. [\[DOI\]](#)
- [6] Caunt CJ, Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS J*, 2013, 280(2): 489–504. [\[DOI\]](#)
- [7] 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. *Sci Rep*, 2016, 6: 29781. [\[DOI\]](#)
- [8] Whitmarsh AJ, Davis RJ. Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci*, 1998, 23(12): 481–485. [\[DOI\]](#)
- [9] Bardwell AJ, Flatauer LJ, Matsukuma K, Thorner J, Bardwell L. A conserved docking site in MEKs mediates high-affinity binding to MAP kinases and cooperates with a scaffold protein to enhance signal transmission. *J Biol Chem*, 2001, 276(13): 10374–10386. [\[DOI\]](#)
- [10] Takekawa M, Tatebayashi K, Saito H. Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinases. *Mol Cell*, 2005, 18(3): 295–306. [\[DOI\]](#)
- [11] Cardinale F, Meskiene I, Ouaked F, Hirt H. Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell*, 2002, 14(3): 703–711. [\[DOI\]](#)
- [12] Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreiss M, Zhang SQ, Hirte H, Wilsone C, Heberle-Borse E, Ellisf BE, Morris PC, Innesh RW, Eckeri JR, Scheel D, Klessigk DF, Machidal Y, Mundym J, Ohashin Y, Walkero JC. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(7): 301–308. [\[DOI\]](#)
- [13] Jiang M, Chu ZQ. Comparative analysis of plant MKK gene family reveals novel expansion mechanism of the members and sheds new light on functional conservation. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 407. [\[DOI\]](#)
- [14] Zhang MM, Su JB, Zhang Y, Xu J, Zhang SQ. Conveying endogenous and exogenous signals: MAPK cascades in plant growth and defense. *Curr Opin Plant Biol*, 2018, 45(Pt A): 1–10. [\[DOI\]](#)
- [15] 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. *Cell Res*, 2008, 18(12): 1190–1198. [\[DOI\]](#)
- [16] Qiu JL, Zhou L, Yun BW, Nielsen HB, Fiil BK, Petersen K, Mackinlay J, Loake GJ, Mundy J, Morris PC. *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiol*, 2008, 148(1): 212–222. [\[DOI\]](#)
- [17] Kong Q, Qu N, Gao MH, Zhang ZB, Ding XJ, Yang F, Li YZ, Dong OX, Chen S, Li X, Zhang YL. The MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 kinase cascade negatively regulates immunity mediated by a mitogen-activated protein kinase kinase kinase in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2012, 24(5): 2225–2236. [\[DOI\]](#)
- [18] Zhao CZ, Wang PC, Si T, Hsu CC, Wang L, Zayed O, Yu ZP, Zhu YF, Dong J, Tao WA, Zhu JK. MAP kinase cascades regulate the cold response by modulating ICE1 protein stability. *Dev Cell*, 2017, 43(5): 618–629.e5. [\[DOI\]](#)
- [19] Xing Y, Jia WS, Zhang JH. AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signaling in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2008, 54(3): 440–451. [\[DOI\]](#)
- [20] Melikant B, Giuliani C, Halbmayer-Watzina S, Limmongkon A, Heberle-Bors E, Wilson C. The *Arabidopsis thaliana* MEK AtMKK6 activates the MAP kinase AtMPK13. *FEBS Lett*, 2004, 576(1–2): 5–8. [\[DOI\]](#)

- [21] Li YY, Cai HX, Liu P, Wang CY, Gao HY, Wu CA, Yan K, Zhang SZ, Huang JG, Zheng CC. *Arabidopsis* MAPKKK18 positively regulates drought stress resistance via downstream MAPKK3. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484(2): 292–297. [DOI]
- [22] Takahashi F, Yoshida R, Ichimura K, Mizoguchi T, Seo S, Yonezawa M, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2007, 19(3): 805–818. [DOI]
- [23] Sethi V, Raghuram B, Sinha AK, Chattopadhyay S. A mitogen-activated protein kinase cascade module, MKK3-MPK6 and MYC2, is involved in blue light-mediated seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2014, 26(8): 3343–3357. [DOI]
- [24] Dai Y, Wang HZ, Li BH, Huang J, Liu XF, Zhou YH, Mou ZL, Li JY. Increased expression of MAP KINASE KINASE7 causes deficiency in polar auxin transport and leads to plant architectural abnormality in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2006, 18(2): 308–320. [DOI]
- [25] Lei L, Li Y, Wang Q, Xu J, Chen YF, Yang HL, Ren DT. Activation of MKK9-MPK3/MPK6 enhances phosphate acquisition in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, 2014, 203(4): 1146–1160. [DOI]
- [26] Xu J, Li Y, Wang Y, Liu HX, Lei L, Yang HL, Liu GQ, Ren DT. Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2008, 283(40): 26996–27006. [DOI]
- [27] Yoo SD, Cho YH, Tena G, Xiong Y, Sheen J. Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in *C₂H₄* signalling. *Nature*, 2008, 451(7180): 789–795. [DOI]
- [28] Soyano T, Nishihama R, Morikiyo K, Ishikawa M, Machida Y. NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis. *Genes Dev*, 2003, 17(8): 1055–1067. [DOI]
- [29] Kong XP, Pan JW, Zhang MY, Xing X, Zhou Y, Liu Y, Li DP, Li DQ. 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*, 2011, 34(8): 1291–1303. [DOI]
- [30] Cai GH, Wang GD, Wang L, Liu Y, Pan JW, Li DQ. A maize mitogen-activated protein kinase kinase, ZmMKK1, positively regulated the salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *J Plant Physiol*, 2014, 171(12): 1003–1016. [DOI]
- [31] Lu WJ, Chu XQ, Li YZ, Wang C, Guo XQ. Cotton GhMKK1 induces the tolerance of salt and drought stress, and mediates defence responses to pathogen infection in transgenic *Nicotiana benthamiana*. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68503. [DOI]
- [32] Wang C, Lu W, He X, Wang F, Zhou Y, Guo X, Guo X. The cotton mitogen-activated protein kinase kinase 3 functions in drought tolerance by regulating stomatal responses and root growth. *Plant Cell Physiol*, 2016, 57(8): 1629–1642. [DOI]
- [33] Xu HY, Zhang C, Li ZC, Wang ZR, Jiang XX, Shi YF, Tian SN, Braun E, Mei Y, Qiu WL, Li S, Wang B, Xu J, Navarre D, Ren D, Cheng N, Nakata PA, Graham MA, Whitham SA, Liu JZ. The MAPK kinase GmMEKK1 regulates cell death and defense responses. *Plant Physiol*, 2018, 178(2): 907–922. [DOI]
- [34] Kiegl S, Cardinale F, Siligan C, Gross A, Baudouin E, Liwosz A, Eklöf S, Till S, Bögre L, Hirt H, Meskiene I. SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *Plant Cell*, 2000, 12(11): 2247–2258. [DOI]
- [35] Wang XJ, Zhu SY, Lu YF, Zhao R, Xin Q, Wang XF, Zhang DP. Two coupled components of the mitogen-activated protein kinase cascade MdMPK1 and MdMKK1 from apple function in ABA signal transduction. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(5): 754–766. [DOI]
- [36] Xie G, Kato H, Imai R. Biochemical identification of the OsMKK6-OsMPK3 signalling pathway for chilling stress tolerance in rice. *Biochem J*, 2012, 443(1): 95–102. [DOI]
- [37] Xu R, Duan PG, Yu HY, Zhou ZK, Zhang BL, Wang RC, Li J, Zhang GZ, Zhuang SS, Lyu J, Li N, Chai T, Tian ZX, Yao SG, Li YH. Control of grain size and weight by the OsMKKK10-OsMKK4-OsMAPK6 signaling pathway in rice. *Mol Plant*, 2018, 11(6): 860–873. [DOI]
- [38] Huang XZ, Yang LF, Jin YH, Lin J, Liu F. Generation, annotation, and analysis of a large-scale expressed sequence tag library from *Arabidopsis pumila* to explore salt-responsive genes. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 955. [DOI]
- [39] Zhang HB, Liu P, Liu LH, Lan HY, Zhang FC. Preliminary study on salt tolerance of ephemeral plant *Arabidopsis pumila* in Xinjiang. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2007, 27(2): 286–290.
- 张海波, 刘彭, 刘立鸿, 兰海燕, 张富春. 新疆短命植物小拟南芥耐盐性的初步研究. 西北植物学报, 2007, 27(2): 286–290. [DOI]

- [40] Yang LF, Jin YH, Huang W, Sun Q, Liu F, Huang XZ. Full-length transcriptome sequences of ephemeral plant *Arabidopsis pumila* provides insight into gene expression dynamics during continuous salt stress. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 717. [DOI]
- [41] Chang JZ, Yan FX, Qiao LY, Zheng J, Zhang FY, Liu QS. Genome-wide identification and expression analysis of SBP-box gene family in *Sorghum bicolor* L. *Hereditas (Beijing)*, 2016, 38(6): 569–580.
常建忠, 闫凤霞, 乔麟轶, 郑军, 张福耀, 柳青山. 高粱 SBP-box 基因家族全基因组鉴定及表达分析. *遗传*, 2016, 38(6): 569–580. [DOI]
- [42] Schilling S, Kennedy A, Pan S, Jermini LS, Melzer R. Genome-wide analysis of MIKC-type MADS-box genes in wheat: pervasive duplications, functional conservation and putative neofunctionalization. *New Phytol*, 2020, 225(1): 511–529. [DOI]
- [43] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725–2729. [DOI]
- [44] Xu L, Chen W, Si GY, Huang YY, Lin Y, Cai YP, Gao JS. Genome-wide analysis of the GST gene family in *Gossypium hirsutum* L. *Hereditas (Beijing)*, 2017, 39(8): 737–752.
许磊, 陈文, 司国阳, 黄艺园, 林毅, 蔡永萍, 高俊山. 陆地棉 GST 基因家族全基因组分析. *遗传*, 2017, 39(8): 737–752. [DOI]
- [45] Xue HY, Xu GX, Guo CC, Shan HY, Kong HZ. Comparative evolutionary analysis of MADS-box genes in *Arabidopsis thaliana* and *A. lyrata*. *Biodiv Sci*, 2010, 18(2): 109–124.
薛皓月, 徐桂霞, 国春策, 山红艳, 孔宏智. 拟南芥和琴叶拟南芥中 MADS-box 基因的比较进化分析. *生物多样性*, 2010, 18(2): 109–124. [DOI]
- [46] Tang K, Dong CJ, Liu JY. Genome-wide comparative analysis of the phospholipase D gene families among allotetraploid cotton and its diploid progenitors. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0156281. [DOI]
- [47] Wang M, Yue H, Feng KW, Deng PC, Song WN, Nie XJ. Genome-wide identification, phylogeny and expression profiles of mitogen activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) gene family in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 668. [DOI]
- [48] Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-Gracia A. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol Biol Evol*, 2017, 34(12): 3299–3302. [DOI]
- [49] Yadav CB, Bonthala VS, Muthamilarasan M, Pandey G, Khan Y, Prasad M. Genome-wide development of transposable elements-based markers in foxtail millet and construction of an integrated database. *DNA Res*, 2015, 22(1): 79–90. [DOI]
- [50] Jin X, Zhu L, Yao Q, Meng X, Ding G, Wang D, Xie Q, Tong Z, Tao C, Yu L, Li H, Wang X. Expression profiling of mitogen-activated protein kinase genes reveals their evolutionary and functional diversity in different rubber tree (*Hevea brasiliensis*) cultivars. *Genes (Basel)*, 2017, 8(10): 261. [DOI]
- [51] Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, Jones SJ, Marra MA. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res*, 2009, 19(9): 1639–1645. [DOI]
- [52] Jiang M, Wen F, Cao JM, Li P, She J, Chu ZQ. Genome-wide exploration of the molecular evolution and regulatory network of mitogen-activated protein kinase cascades upon multiple stresses in *Brachypodium distachyon*. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 228. [DOI]
- [53] Liang W, Yang B, Yu BJ, Zhou Z, Li C, Jia M, Sun Y, Zhang Y, Wu F, Zhang H, Wang B, Deyholos MK, Jiang YQ. Identification and analysis of MKK and MPK gene families in canola (*Brassica napus* L.). *BMC Genomics*, 2013, 14: 392. [DOI]
- [54] Wang J, Pan CT, Wang Y, Ye L, Wu J, Chen LF, Zou T, Lu G. Genome-wide identification of MAPK, MAPKK, and MAPKKK gene families and transcriptional profiling analysis during development and stress response in cucumber. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 386. [DOI]
- [55] Shan HX, Fu C. The recent advances on plant MAPK cascade pathway under adverse stress conditions. *J Nucl Agric Sci*, 2017, 31(4): 680–688.
单鸿轩, 付畅. 逆境胁迫下植物 MAPK 级联反应途径研究新进展. *核农学报*, 2017, 31(4): 680–688. [DOI]
- [56] Zhu X, Wang M, Li X, Jiu S, Wang C, Fang J. Genome-wide analysis of the sucrose synthase gene family in grape (*Vitis vinifera*): structure, evolution, and expression profiles. *Genes (Basel)*, 2017, 8(4): 111. [DOI]
- [57] Cui LC, Yang G, Yan JL, Pan Y, Nie XJ. Genome-wide identification, expression profiles and regulatory network of MAPK cascade gene family in barley. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 750. [DOI]
- [58] Wu J, Wang J, Pan CT, Guan XY, Wang Y, Liu SY, He YJ, Chen JL, Chen LF, Lu G. Genome-wide identification of MAPKK and MAPKKK gene families in tomato and transcriptional profiling analysis during development and

- stress response. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103032. [DOI]
- [59] Zhang SZ, Xu RR, Luo XC, Jiang ZS, Shu HR. Genome-wide identification and expression analysis of MAPK and MAPKK gene family in *Malus domestica*. *Gene*, 2013, 531(2): 377–387. [DOI]
- [60] Kong XP, Lv W, Zhang D, Jiang SS, Zhang SZ, Li DQ. Genome-wide identification and analysis of expression profiles of maize mitogen-activated protein kinase kinase. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57714. [DOI]
- [61] Chen LH, Hu W, Tan SL, Wang M, Ma ZB, Zhou SY, Deng XM, Zhang Y, Huang C, Yang GX, He GY. Genome-wide identification and analysis of MAPK and MAPKK gene families in *Brachypodium distachyon*. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46744. [DOI]
- [62] Rao KP, Richa T, Kumar K, Raghuram B, Sinha AK. In silico analysis reveals 75 members of mitogen-activated protein kinase kinase gene family in rice. *DNA Res*, 2010, 17(3): 139–153. [DOI]
- [63] Hoffmann MH, Schmuths H, Koch C, Meister A, Fritsch RM. Comparative analysis of growth, genome size, chromosome numbers and phylogeny of *Arabidopsis thaliana* and three co-occurring species of the *Brassicaceae* from Uzbekistan. *J Bot*, 2010. Article ID 504613. DOI:10.1155/2010/504613. [DOI]
- [64] Van de Peer Y, Maere S, Meyer A. The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(10): 725–732. [DOI]
- [65] Hu TT, Pattyn P, Bakker EG, Cao J, Cheng JF, Clark RM, Fahlgren N, Fawcett JA, Grimwood J, Gundlach H, Haberer G, Hollister JD, Ossowski S, Ottillar RP, Salamov AA, Schneeberger K, Spannagl M, Wang X, Yang L, Nasrallah ME, Bergelson J, Carrington JC, Gaut BS, Schmutz J, Mayer KF, Van de Peer Y, Grigoriev IV, Nordborg M, Weigel D, Guo YL. The *Arabidopsis lyrata* genome sequence and the basis of rapid genome size change. *Nat Genet*, 2011, 43(5): 476–481. [DOI]
- [66] Gu YB, Ji ZR, Chi FM, Qiao Z, Xu CN, Zhang JX, Zhou ZS, Dong QL. Genome-wide identification and expression analysis of the WRKY gene family in peach. *Hereditas(Beijing)*, 2016, 38(3): 254–270.
谷彦冰, 冀志蕊, 迟福梅, 乔壮, 徐成楠, 张俊祥, 周宗山, 董庆龙. 桃 WRKY 基因家族全基因组鉴定和表达分析. 遗传, 2016, 38(3): 254–270. [DOI]
- [67] Zhang T, Qiao Q, Novikova PY, Wang Q, Yue J, Guan Y, Ming S, Liu T, De J, Liu Y, Al-Shehbaz IA, Sun H, Van Montagu M, Huang J, Van de Peer Y, Qiong L. Genome of *Crucihimalaya himalaica*, a close relative of *Arabidopsis*, shows ecological adaptation to high altitude. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(14): 7137–7146. [DOI]
- [68] Maere S, De Bodt S, Raes J, Casneuf T, Van Montagu M, Kuiper M, Van de Peer Y. Modeling gene and genome duplications in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(15): 5454–5459. [DOI]
- [69] Jiao Y, Wickett NJ, Ayyampalayam S, Chanderbali AS, Landherr L, Ralph PE, Tomsho LP, Hu Y, Liang H, Soltis PS, Soltis DE, Clifton SW, Schlarbaum SE, Schuster SC, Ma H, Leebens-Mack J, de Pamphilis CW. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature*, 2011, 473(7345): 97–100. [DOI]
- [70] Blanc G, Wolfe KH. Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell*, 2004, 16(7): 1667–1678. [DOI]
- [71] Ueno Y, Yoshida R, Kishi-Kaboshi M, Matsushita A, Jiang CJ, Goto S, Takahashi A, Hirochika H, Takatsuji H. Abiotic stresses antagonize the rice defence pathway through the tyrosine-dephosphorylation of OsMPK6. *PLoS Pathog*, 2015, 11(10): e1005231. [DOI]
- [72] 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. *Nature*, 2002, 415(6875): 977–983. [DOI]
- [73] Li H, Ding YL, Shi YT, Zhang XY, Zhang SY, Gong ZZ, Yang SH. MPK3- and MPK6-mediated ICE1 phosphorylation negatively regulates ICE1 stability and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 2017, 43(5): 630–642.e4. [DOI]
- [74] Zhu Q, Shao Y, Ge S, Zhang M, Zhang T, Hu X, Liu Y, Walker J, Zhang S, Xu J. A MAPK cascade downstream of IDA-HAE/HSL2 ligand-receptor pair in lateral root emergence. *Nat Plants*, 2019, 5(4): 414–423. [DOI]
- [75] Li K, Yang F, Zhang G, Song S, Li Y, Ren D, Miao Y, Song CP. AIK1, A mitogen-activated protein kinase, modulates abscisic acid responses through the MKK5-MPK6 kinase cascade. *Plant Physiol*, 2017, 173(2): 1391–1408. [DOI]

(责任编辑: 张根发)