

文章编号: 1674-7054(2019)02-0119-08

木薯 MKK 家族基因的鉴定及表达分析

侯鹏宇, 于心怡, 肖晓蓉, 郑琳琳, 陈银华

(海南大学 热带农林学院 / 海南省热带生物资源利用重点实验室, 海口 570228)

摘要: MAPK 级联传导通路是广泛存在于真核生物体内的信号传导途径。根据木薯全基因组数据, 借鉴拟南芥中 MAPKK (MKK) 家族的基因序列, 通过生物信息学方法对木薯中 MKK 家族成员进行全面的鉴定以及系统进化树分析。通过激素处理及病原菌接种来分析 MKK 家族各基因的表达模式。结果表明, 木薯总共编码 11 个 MKK 基因, 这些基因集中分布于木薯第 3, 4, 6, 10, 12, 16, 17 条染色体上。MKK 家族各基因在木薯受到激素处理及病原菌处理后的表达分析结果表明, MKKs 能够响应 ABA, JA 及病原菌信号, 对 ACC 信号则不敏感。MKK4, MKK5, MKK8, MKK9, MKK11 可能参与木薯相关防御病原菌及激素信号传导通路。

关键词: 木薯; MKK 基因; 鉴定; 表达分析

中图分类号: S 553

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2019.02.004

当植物受到外界环境胁迫(包括生物胁迫和非生物胁迫)时, 植物体内会产生多种激素和信号分子来调控一些基因的表达从而激发植物防御反应^[1-3]。当前研究最主要的 1 个防御通路就是丝裂原活化蛋白激酶 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 级联途径, 该通路由 3 层激酶 MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) -MKK (MAPKK) (mitogen-activated protein kinase kinase) -MAPK 组成^[4-8], 是在酵母、植物、动物、人类等真核生物中普遍存在的一类苏氨酸/丝氨酸蛋白激酶信号传导系统^[9-10], 其机理是通过逐级磷酸化的方式将多种胁迫信号逐级放大, 传递给靶蛋白从而调控细胞质内或细胞核基因的下游基因的表达, 在植物生长发育、胁迫应答和抗病反应中都能够发挥重要作用^[11-17]。在植物的生长发育中, MAPK 级联参与了包括配子形成、胚胎发生、形态发生、衰老、脱落受精和种子形成等过程^[18]。大量实验证据表明, MAPK 信号传导通路参与了植物对低温、干旱、高盐、活性氧等生物与非生物胁迫的响应^[19-21]。在模式生物拟南芥中, 有 2 条信号途径被确定, 第 1 条通路是 MEKK1-MKK4/5-MPK3/6, 被证明在植物的先天免疫应答过程中起着正向调控的作用^[22-23]; 第 2 条通路是 MEKK1-MKK1/2-MPK4, 在拟南芥对病原菌的抗性应答和对病毒的防御应答中起着负向调控的作用^[24], 这两个 MAPK 级联途径可能互相作用, 调控不同逆境刺激下的相应基因表达。此外, 在不同的植物物种里存在不同的 MAPK 信号传导通路, 但是这些通路在传导不同的信号分子时会受到严格的控制。此外, 植物激素参与复杂的信号传导途径, 调节植物生长发育, 在生物与非生物胁迫应答中发挥重要作用。有证据表明, 植物抗性激素 SA (水杨酸, salicylic acid)、ET (乙烯, ethylene) 和 JA (茉莉酸, jasmonic acid) 在植物抵抗病原菌侵染过程中都发挥着重要作用^[25-27]。SA 信号途径触发活体营养型病原引起的抗病反应, ET 和 JA 信号主要介导植物对营养性病原菌的抗性。并且 SA、ET 和 JA 信号途径在植物抗病反应过程中存在协同或拮抗的交叉作用。作为 MAPK 级联信号途径的中间组分, MKK 整合不同 MAPKKK 接受的多类信号, 在植物信号转导途径

收稿日期: 2019-01-28

修回日期: 2019-02-27

基金项目: 海南省研究生创新科研课题 (Hys2018-02); 国家自然科学基金 (31560497)

作者简介: 侯鹏宇 (1992-), 女, 海南大学热带农林学院 2016 级硕士研究生, E-mail: 18789078283@163.com

通信作者: 郑琳琳 (1983-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 分子遗传学, E-mail: hildagarde@163.com

中起着信号枢纽的作用。对 MKK 的研究是解析 MAPK 级联信号途径调控植物生长发育和响应生物、非生物胁迫等多种生物学过程的关键所在^[28]。有研究表明 MKK 家族基因能够发挥许多调节功能,通过信号传导调节植物的生长、发育及对恶劣环境的耐受性等多种关键的生理反应过程。然而不管是在拟南芥还是在其他植物中, MKK 基因的数量都小于 MAPK。如拟南芥中有 20 个 MAPK 基因及 10 个 MKK 基因;水稻中有 17 个 MAPK 基因及 8 个 MKK 基因;番茄中有 16 个 MAPK 基因以及 5 个 MAPKK 基因^[29-32]等。数量上的不对等就意味着一个 MKK 可以对应多个 MAPK。人们系统地研究了拟南芥、水稻、番茄等作物中的 MAPK 信号传导途径,但在木薯中还没有深入的研究,尚未有较完整的系统报道,因而,研究木薯 MKKs 在木薯抗病抗逆过程中的功能及作用机理不仅可以丰富 MAPK 级联信号途径理论体系,而且对进一步明确木薯抗病抗逆分子机理及选育木薯抗病抗逆品种也有十分重要的价值。

1 材料与方法

1.1 材料及处理 以本实验室的木薯栽培品种‘华南 8 号(SC8)’组培苗为实验材料,选取生长 30 d 且生长状况一致的组培苗,分别用浓度为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 JA(茉莉酸)、ACC(乙烯利)及 ABA(脱落酸)溶液喷洒植株,每种各处理 30 棵苗,分别于处理后 0、0.5、1、2、4、6 h 取样。同时将本实验室提供的黄单胞菌 *Xam11* 摇至 $OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$,通过打孔接种法共处理 100 棵苗,于处理后 0、1、3、6、12、72、96、120、144、168、192 h 取样。取得的样品置于液氮速冻后存于 -80°C 冰箱保存待用,每个时间点设置 3 个重复,取其平均值对 MKK 家族各基因的表达模式进行分析。

1.2 木薯 MKK 家族基因鉴定与命名 通过 BLASTP 软件将木薯全基因组数据与拟南芥 MKK 蛋白序列进行比对,从而搜索木薯中的同源 MKK 序列并根据这些序列在染色体上的位置进行系统的命名。木薯全基因组数据下载于木薯数据库 Phytozome(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>),拟南芥 MKK 蛋白序列来自拟南芥数据库 Tair(<https://www.arabidopsis.org>)。

1.3 木薯 MKK 家族进化分析 将拟南芥及木薯 MKK 家族基因的序列转化为 fasta 格式,并运用 MEGA7.0(<http://www.megasoftware.net/>)中的 ClustalW 软件对其进行多序列联配分析,通过邻接法(Neighbor-joining method, NJ)构建木薯 MKK 家族基因的系统进化树,Bootstrap 值设为 1 000。

1.4 总 RNA 的提取及反转录 以采集到的样品为模板,参照植物总 RNA 提取试剂(TIAGEN, Beijing)说明书提取总 RNA,之后通过琼脂糖电泳凝胶的方法对提取的 RNA 的质量进行检测。使用 oligo(dT)引物和 PremixScript(TaKaRa, Japan)的反转录盒进行反转录。用木薯内参基因 *Tubulin* 进行 RT-PCR 检测。检测可用后即以这些 cDNA 为模板进行后续实验。

1.5 基因序列下载及引物设计 下载木薯 MKK 家族基因的 CDS 序列,运用 Oligo7 软件根据 CDS 序列设计木薯 MKK 家族基因的实时定量 PCR 的引物(表 1),将设计好的引物序列放到木薯全基因组数据库中进行搜索,确定为特异性引物。

1.6 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析表达模式 为了分析木薯 MKK 家族基因在非生物胁迫下的表达模式,笔者对木薯苗进行了 ACC、ABA、JA 及 XAM 菌处理,以反转录后的 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR,其程序为 95°C 1 min 变性,其后 95°C 10 s, 55°C 15 s, 72°C 30 s,共 40 个循环。其中,以木薯基因 *Tubulin* 作为内参基因对数据进行标准化处理。重复 3 次。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Tab. 1 Primer sequences used in qRT-PCR

基因 Gene	正向引物 Forward Primer	反向引物 Reverse Primer
<i>Tubulin</i>	5'-ATGCGTTCTTGATGTTGTTG-3'	5'-TCGGTGAAGGGAATACAGAGA-3'
<i>MKK1</i>	5'-TCTCTCCCTCCTCCCGATGA-3'	5'-TCCATTTATGTTGCACCACT-3'
<i>MKK2</i>	5'-TATCTACACCATGAGCGACA-3'	5'-CTCCCGCTAATTCGCTCT-3'
<i>MKK3</i>	5'-TGAAAGGATCAACACGGACT-3'	5'-GGCTCCCTTTGCAGACAAC-3'
<i>MKK4</i>	5'-AAACTACAGTGCCGTGCTCA-3'	5'-GCCCTTTAGATTCAACAAGCAG-3'
<i>MKK5</i>	5'-ATACCGATGACTCCCTCGTTC-3'	5'-GCGTATCAAGCGTACCCAA-3'
<i>MKK6</i>	5'-CGCCCCTTATTAGGCCAT-3'	5'-TAAAACATGACCACGTTTGAC-3'
<i>MKK7</i>	5'-GCACGACTACAAAAGTGACA-3'	5'-TTCAGATGTTGACCGTCTC-3'
<i>MKK8</i>	5'-TTTACTTGCCCATGTTGCTC-3'	5'-TTCACAATCCTGCTAACTCC-3'
<i>MKK9</i>	5'-TAGGCGTTCTGACTTAACCC-3'	5'-TCCTATGCGATTGATTCGG-3'
<i>MKK10</i>	5'-CATACCTTGCTGCGATCTGT-3'	5'-CCATTATTGCACTCAGCCAA-3'
<i>MKK11</i>	5'-TGCTTGTAGGTCACTATCCA-3'	5'-CAACTGTCCCTCTCTTGCTCC-3'

2 结果与分析

2.1 木薯 MKK 家族基因的鉴定与染色体定位 利用木薯全基因组数据库及拟南芥中已经鉴定出的 MKK 家族数据鉴定出木薯中 MKK 家族共有 11 个成员。对其染色体定位分析表明,木薯的 11 个 MKK 家族成员不均匀地分布在木薯的 7 条染色体上(图 1)。其中木薯的第 3 条染色体上有 3 个 MKK 家族基因,是木薯 MKKs 分布最多的染色体。

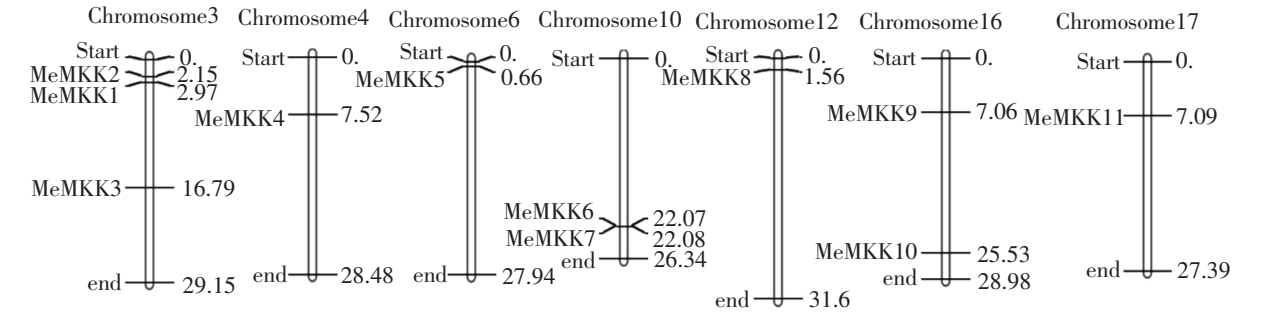


图 1 MeMKK 家族基因在木薯染色体上的位置分布
Fig.1 Genomic locations of MeMKK genes on the Manihot esculenta chromosomes

2.2 木薯 MKK 系统进化分析 在模式生物拟南芥中,有一部分 MKK 基因的功能已经明确,它们参与了植物生长发育调控、激素信号转导、生物和非生物胁迫的过程。笔者构建了拟南芥与木薯 MKK 家族基因的系统进化树(图 2)。由图 2 可知,MeMKK11 与 AtMKK10,MeMKK4 与 AtMKK3,MeMKK2 与 AtMKK6,MeMKK1,MeMKK10 与 AtMKK1 之间有较高的同源性,因而可以猜测在木薯中这些基因也参与植物防御反应。

2.3 木薯 MKK 家族表达模式分析

2.3.1 ABA 处理下的表达分析 使用 ABA 溶液处理木薯苗(图 3)。除 MKK7 以外 MKK 家族其余基因在处理后的整体

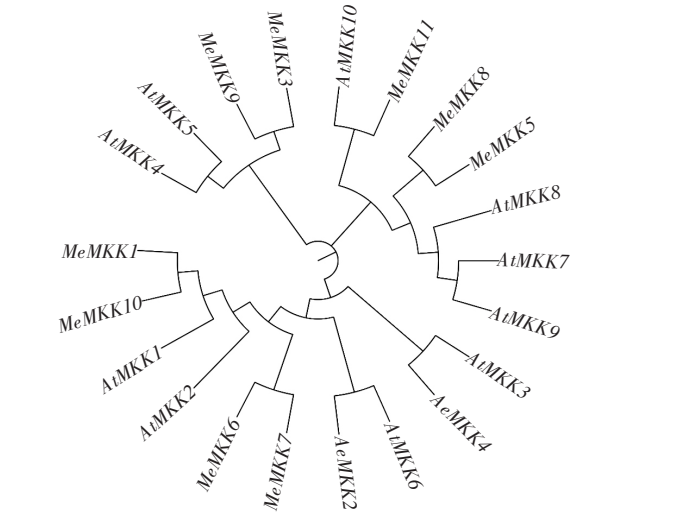


图 2 木薯 MKK 基因与拟南芥 MKK 基因进化树
Fig.2 The phylogenetic tree of MKK genes of cassava and Arabidopsis

呈现表达升高趋势。*MKK8*、*MKK9*、*MKK11* 在处理 4 h 内表达变化不明显,在 6 h 处出现表达峰值,其中 *MKK8* 的表达量约是 0 h 的 85 倍,*MKK9*、*MKK11* 的表达分别为 0 h 的 25 及 20 倍;*MKK4*、*MKK5* 对 JA 的响应次之,*MKK4* 在 0.5 h 处的表达最高,而 *MKK5* 在 4 h 时的表达量最高。其余基因的表达变化均不明显,可忽略不计。因而可以推测 MKK 家族参与了木薯体内 ABA 信号通路,且 *MKK4*、*MKK5*、*MKK8*、*MKK9*、*MKK11* 可能在其中发挥重要作用。

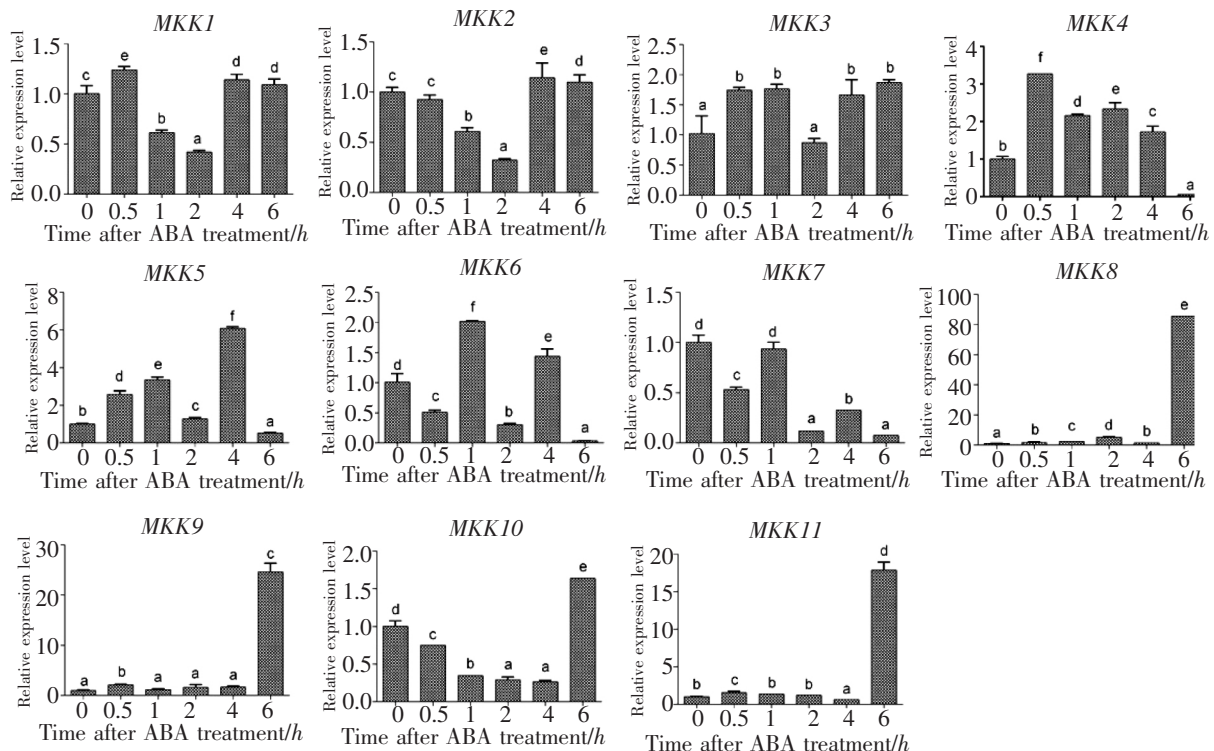


图3 木薯 MKKs 在 ABA 处理下的表达分析

Fig.3 Expression analysis of MKKs of cassava in response to ABA

2.3.2 ACC 处理下的表达分析 使用 ACC 溶液处理木薯苗(图 4)。在 ACC 处理后木薯 MKKs 的表达均没有特别急剧的变化。其中 *MKK4*、*MKK5*、*MKK8* 在处理后的表达量有相对明显的变化,表达量最高时均为 0 h 时的 5 倍左右,*MKK4*、*MKK5* 在 6 h 时有最高的表达量,而 *MKK8* 表达量最高是在 2 h 处且在 6 h 时基本不表达。此外,*MKK2*、*MKK7* 在处理后的整体呈现表达量降低的现象,最低时下降至 0 h 时的 20%,在 6 h 时 *MKK2* 基本恢复正常表达水平,而 *MKK7*、*MKK11* 则基本不表达。其他基因的表达变化可忽略不计,因而可以推测木薯 MKK 基因可能不参与 ACC 引起的信号通路。

2.3.3 JA 处理下的表达分析 使用 JA 溶液处理木薯苗(图 5)。木薯 MKK 家族基因中,除 *MKK7* 以外其他基因均整体呈现表达升高趋势。其中 *MKK1*、*MKK2*、*MKK3* 对 JA 的响应最强烈,均在 1 h 处出现小峰值,在 4 h 处出现表达峰值,在 4 h 时 *MKK1*、*MKK3* 的表达约是 0 h 时的 2 000 倍,*MKK2* 的表达约是 0 h 的 1 200 倍;*MKK4*、*MKK5*、*MKK11* 对 JA 的响应次之,均在 1 h 处出现表达峰值,其中 *MKK4*、*MKK11* 的表达量约为 0 h 时的 30 倍,*MKK5* 的表达约为 0 h 时的 11 倍;其余基因的表达变化十分微弱可忽略不计。因而推测木薯 MKK 家族基因可能参与 JA 引起的信号通路,且 *MKK1*、*MKK2*、*MKK3*、*MKK4*、*MKK5* 和 *MKK11* 可能在其中起到重要作用。

2.3.4 Xam 病原菌接种后的表达分析 对木薯苗进行病原菌 Xam11 接种处理(图 6)。在接种后,*MKK4*、*MKK8*、*MKK11* 的表达量有比较明显的变化,*MKK4* 的表达量升高了约 200 倍,*MKK8* 表达量升高了约 12 倍,*MKK11* 表达量升高了约 20 倍,且这 3 个基因都是在后期表达量最高,*MKK4* 和 *MKK11* 是在 168 h(7 d)处表达量最高,*MKK8* 是在 192 h(8 d)时表达量最高。此外,*MKK7* 在 6 h 处时表达量最高约是 0 h 时的 4 倍,其余基因均没有比较明显的表达,推测 *MKK4*、*MKK8* 和 *MKK11* 可能参与了木薯对病原菌感染的防卫反应。

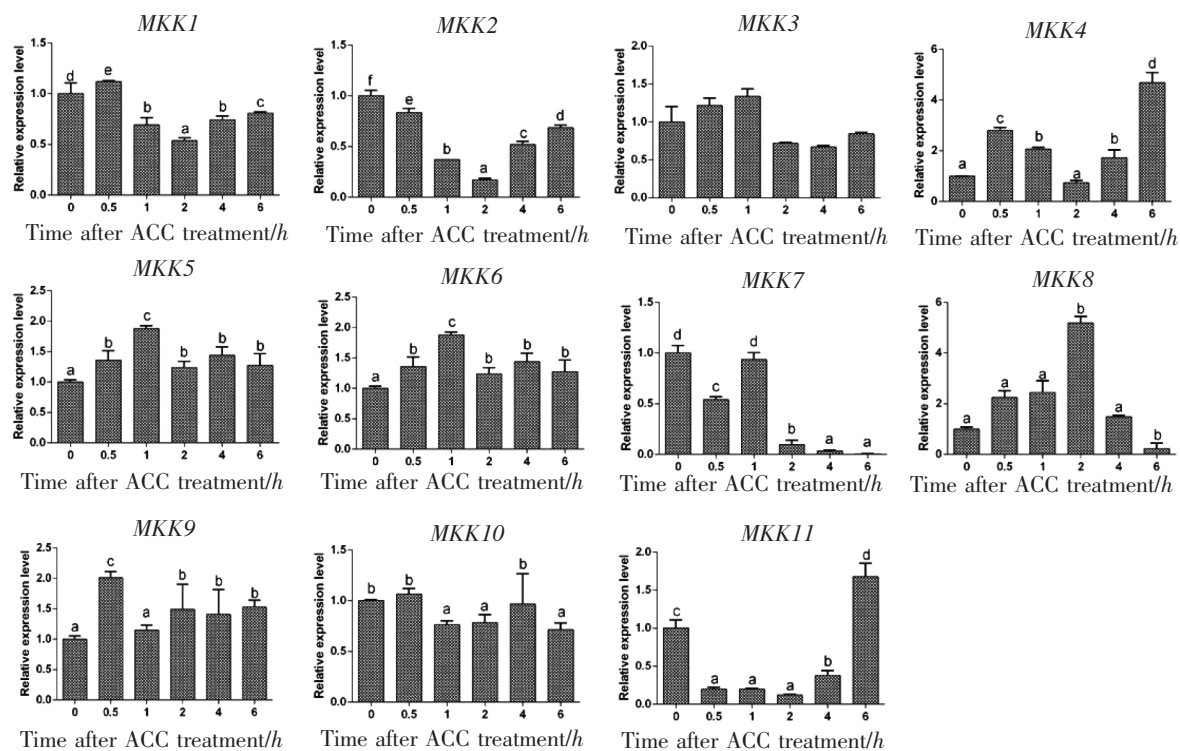


图4 木薯 MKKs 在 ACC 处理下的表达分析

Fig.4 Expression analysis of MKKs of cassava in response to ACC

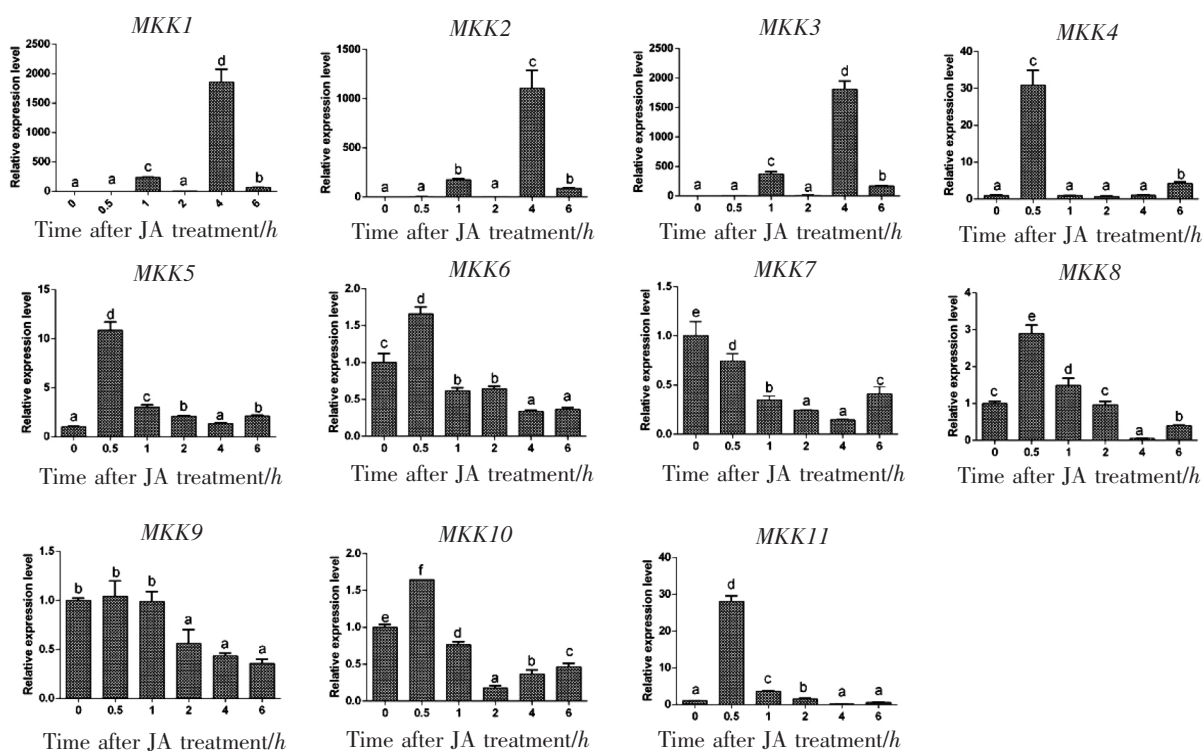


图5 木薯 MKKs 在 JA 处理下的表达分析

Fig.5 Expression analysis of MKKs of cassava in response to JA

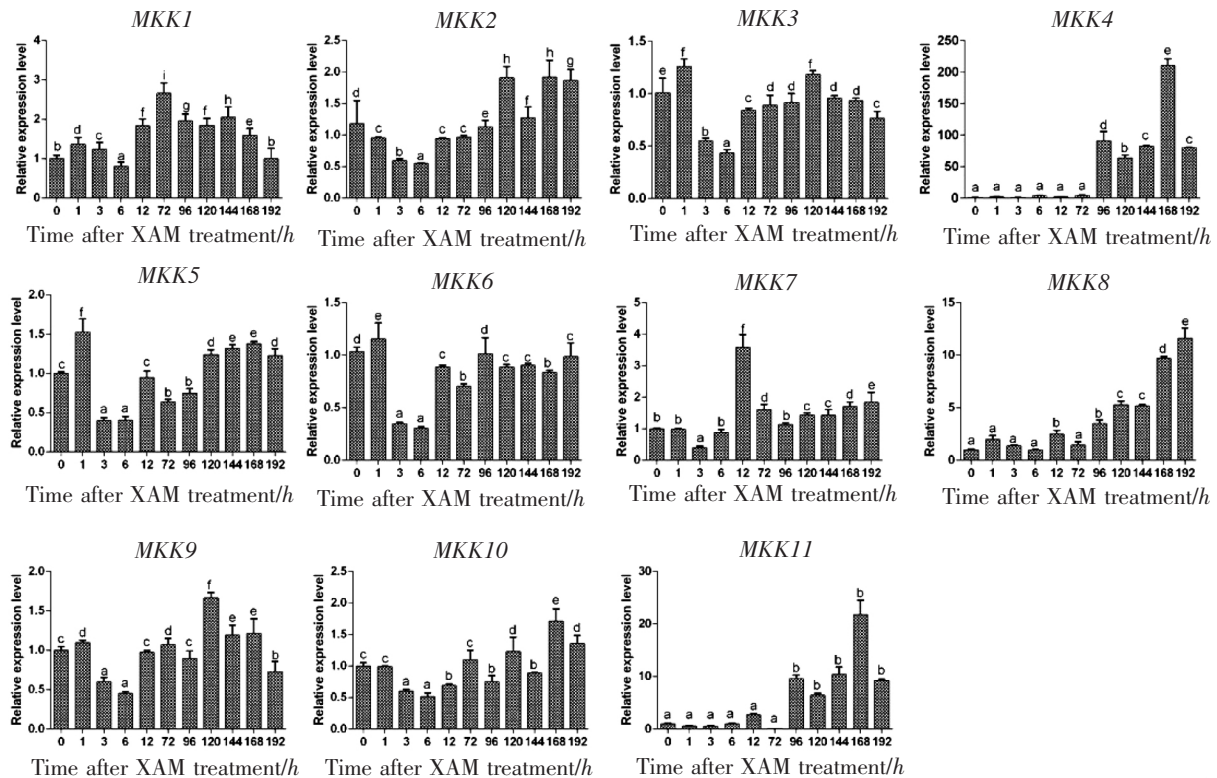


图6 木薯 MKKs 在 Xam 处理下的表达分析

Fig.6 Expression analysis of MKKs of cassava in response to Xam

3 讨论

当植物受到外界环境胁迫以后,体内激素以及信号分子引发调控一系列的生理生化作用,通过层层磷酸化激活 MAPK 信号通路,调控植物的生长发育,从而应对生物胁迫和非生物胁迫。随着对 MAPK 级联通路研究的深入,越来越多的证据显示 MKK 家族成员在植物对信号分子及逆境胁迫应答的过程中起重要作用。当前, MKK 家族基因在拟南芥、玉米、水稻、二穗短柄草、苦瓜、番茄、西瓜以及小麦中都已有了系统研究,如拟南芥中 *MKK1* 和 *MKK2* 在植物对盐胁迫及病原菌侵袭应答的过程中起作用, *MKK3* 参与了植物体内激素与信号分子如 ROS, JA, ABA 等的传导, *MKK7* 则与植物系统获得抗性应答有关等。

笔者用 ABA, ACC, JA 及病原菌 *Xam11* 处理木薯组培苗后,对木薯中的 11 个 MKK 家族成员表达量的变化分别进行了分析。结果表明,在激素处理中对 JA 的响应最为敏感, ABA 次之,对 ACC 几乎不响应。JA 处理前, *MKK1*, *MKK2*, *MKK3*, *MKK4*, *MKK5*, *MKK11* 表达量很低, JA 处理后这些基因表达被激活。 *MKK6* 和 *MKK8* 的表达先上调又下调至处理前水平,说明 MKK 家族基因对 JA 的响应非常敏感; ABA 处理后 11 个基因中共有 5 个基因表达量升高较明显,其中 *MKK8*, *MKK9* 及 *MKK11* 有明显的变化, *MKK4*, *MKK5* 次之。 *MKK10* 在处理后的表达中前期持续下降后期又升高,但包含其在内的其余基因的表达量均没有大的变化。说明木薯 MKK 基因能够响应 ABA 的信号。ACC 处理后, *MKK4*, *MKK5*, *MKK8* 的表达有一定的变化,但是升高倍数不高,而其余基因的表达量相对稳定。说明木薯 MKK 基因对 ACC 的处理可能不敏感,更多通过 JA 信号介导的生理生化机制参与生物胁迫及非生物胁迫的应答。

木薯 MKK 家族基因均响应病原菌 *Xam11* 侵染,其中, *MKK4*, *MKK5*, *MKK8*, *MKK11* 等 4 个基因在激素和病原菌处理后的表达量上调变化强烈,表明这些基因很可能参与木薯抗病原菌 *Xam11* 侵染应答反应;而 *MKK2*, *MKK3*, *MKK5*, *MKK6*, *MKK9*, *MKK10* 这 5 个基因在病原菌处理后表达量出现短暂的下调, 12 h 后开始上调,其中 *MKK9* 和 *MKK10* 的表达量变化相对较弱;此外, *MKK7* 在所有激素处理后均呈现表达降低的趋势,但在病原菌处理后表达升高。

综上所述,木薯 MKK 家族基因对 JA、病原菌的处理都很敏感,对 ABA 处理次之,对 ACC 处理不敏

感,其中 *MKK8*、*MKK9*、*MKK11* 对 ABA 的响应最强烈; *MKK1*、*MKK2*、*MKK3* 对 JA 的响应最强烈; *MKK4*、*MKK8*、*MKK11* 对病原菌最为敏感。这说明木薯 MKK 家族基因参与了 ABA、JA 介导的信号通路以及病原菌侵染产生的防卫反应过程。在此进程中, *MKK4*、*MKK5*、*MKK8*、*MKK9*、*MKK11* 这 5 个基因可能发挥了重要作用。然而这些基因在 MAPK 信号传导通路中的具体作用机理及其与上游 MAPKKK、下游 MAPK 各基因的联系还有待研究。在接下来的实验中可以利用酵母双杂交技术、蛋白质芯片技术(Protein chip)、双分子荧光互补技术(BiFC)、免疫共沉淀技术(Co-IP)以及 pull-down 技术等来分析蛋白质互作情况,也可以通过体外激酶活性检测的方法来分析 MAPK 通路中各级基因具体的磷酸化机制,从而明确木薯中 MAPK 信号通路的情况,这对于今后实验的选题、木薯抗病品种的选育及木薯抗病抗逆分子机理的进一步明确有一定的意义。

参考文献:

- [1] PITZSCHKE A, SCHIKORA A, HIRT H. MAPK cascade signalling networks in plant defence[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2009, 12(4): 421–426.
- [2] MENG X Z, ZHANG S Q. MAPK cascades in plant disease resistance signaling[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2013, 51: 245–266.
- [3] FULING K, JIE W, LIN C, et al. Genome-wide analysis of the mitogen-activated protein kinase gene family in *Solanum lycopersicum*[J]. *Gene*, 2012, 499(1): 108–120.
- [4] NAKAGAMI H, PITZSCHKE A, HIRT H. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling[J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(7): 339–346.
- [5] DANQUAH A, ZELICOURT A, COLCOMBET J, et al. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses[J]. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(1): 40–52.
- [6] YANG T B, CHAUDHURI S, YANG L H, et al. A calcium/calmodulin-regulated member of the receptor-like kinase family confers cold tolerance in plants[J]. *JBC Papers in Press*, 2009, 285(10): 7119–7126.
- [7] HAN S, WANG C W, WANG W L, et al. Mitogen-activated protein kinase 6 controls root growth in *Arabidopsis* by modulating Ca^{2+} -based Na^+ flux in root cell under salt stress[J]. *Journal of plant physiology*, 2014, 171(5): 26–34.
- [8] SUN H K, DONG H W, JAE M K, et al. *Arabidopsis* MKK4 mediates osmotic-stress response via its regulation of MPK3 activity[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 412(1): 150–154.
- [9] LIU Y D, REN D T, SHARON P, et al. 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.
- [10] MCDOWELL M J, JEFFERY L D. Signal transduction in the plant immune response[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2000, 25(2): 79–82.
- [11] KATHY M, DONG H, JÉRÔME G, et al. Transcript profiling in *Vitis riparia* during chilling requirement fulfillment reveals coordination of gene expression patterns with optimized bud break[J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2009, 9(1): 81–96.
- [12] JAI S. R, YANG Y N. 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.
- [13] LEI G and CHENG B X. The genetic locus *Atlg73660* encodes a putative MAPKKK and negatively regulates salt tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67(1/2): 125–134.
- [14] HAMEL L P, NICOLE M C, SRITUBTIM S, et al. Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families[J]. *Trends in Plant Science*, 2006, 11(4): 192–198.
- [15] SONG Q M, LI D Y, DAI Y, et al. Characterization, expression patterns and functional analysis of the MAPK and MAPKK genes in watermelon (*Citrullus lanatus*) [J]. *BMC Plant Biology*, 2015, 15(1): 298.
- [16] REN D, YANG K Y, LI G J, et al. Activation of Ntf4, a tobacco mitogen-activated protein kinase, during plant defense response and its involvement in hypersensitive response-like cell death[J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(4): 1482–1493.
- [17] WANG J, PAN C T, WANG Y, et al. Genome-wide identification of MAPK, MAPKK, and MAPKKK gene families and transcriptional profiling analysis during development and stress response in cucumber[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 386–402.
- [18] ASAI T, TENA G, PLOTNIKOVA J, et al. MAP kinase signaling cascade in *Arabidopsis* innate immunity[J]. *Nature*, 2002, 415(6875): 977–983.

- [19] JIA W Y , LI B H , LI S J , et al. Mitogen-activated protein kinase cascade *MPK7-MPK6* plays important roles in plant development and regulates shoot branching by phosphorylating PIN1 in Arabidopsis [J]. *PLoS Biology* ,2016 ,14(9) : e1002550.
- [20] ZHOU C J , CAI Z H , GUO Y F , et al. An arabidopsis mitogen-activated protein kinase cascade , *MPK9-MPK6* , plays a role in leaf senescence [J]. *Plant Physiology* ,2009 ,150(1) : 167 – 177.
- [21] WANG H C , NGWENYAMA N , LIU Y D , et al. Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in Arabidopsis [J]. *The Plant Cell* ,2007 ,19(1) : 63 – 73.
- [22] SUAREZ R M C , ADAMS P P L , LIU Y D , et al. *MEKK1* is required for flg22-induced *MPK4* activation in Arabidopsis plants [J]. *Plant Physiology* ,2006 ,143(2) : 661 – 669.
- [23] ZHANG X T , CHENG T C , WANG G H , et al. Cloning and evolutionary analysis of tobacco MAPK gene family [J]. *Molecular Biology Reports* ,2013 ,40(2) : 1407 – 1415.
- [24] ZHANG T , CHEN S X , HARMON A C. Protein-protein interactions in plant mitogen-activated protein kinase cascades [J]. *Journal of Experimental Botany* ,2016 ,67(3) : 607 – 618.
- [25] KONG X P , PAN J W , ZHANG D , et al. Identification of mitogen-activated protein kinase kinase gene family and MKK-MAPK interaction network in maize [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications* ,2013 ,441(4) : 964 – 969.
- [26] MARKUS T , ELISABETH S , THOMAS E , et al. The *MKK2* pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis [J]. *Molecular Cell* ,2004 ,15(1) : 141 – 152.
- [27] KONG X P , PAN J W , ZHANG D , et al. Identification of mitogen-activated protein kinase kinase gene family and MKK-MAPK interaction network in maize [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications* ,2013 ,441(4) : 964 – 969.
- [28] HAMEL L P , NICOLE M C , SRITUBTIM S , et al. Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families [J]. *Trends Plant Sci* ,2006 ,11(4) : 192 – 198.
- [29] SINHA A K , JAGGI M , RAGHURAM B , et al. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress [J]. *Plant Signal Behav* ,2011 ,6(2) : 196 – 203.
- [30] ZHAO L , WANG C , ZHU F , et al. Mild osmotic stress promotes 4-methoxy indolyl-3-methyl glucosinolate biosynthesis mediated by the *MKK9-MPK3/MPK6* cascade in Arabidopsis [J]. *Plant Cell Rep* ,2017 ,36(4) : 543 – 555.
- [31] LIU Z , LI Y , CAO H , et al. Comparative phospho-proteomics analysis of salt-responsive phosphoproteins regulated by the *MKK9-MPK6* cascade in Arabidopsis [J]. *Plant Sci* ,2015 ,241: 138 – 150.
- [32] WU D Y , JI J , WANG G , et al . *LeMKK* , a novel group A mitogen-activated protein kinase kinase gene in *Lycium chinense* , confers dehydration and drought tolerance in transgenic tobacco via scavenging ROS and modulating expression of stress-responsive genes [J]. *Plant Growth Regulation* ,2015 ,76(3) : 269 – 279.

Identification and Expression Analysis of MKK Genes in *Cassava*

HOU Pengyu , YU Xinyi , XIAO Xiaorong , ZHENG Linlin , CHEN Yinhua

(Institute of Tropical Agriculture and Forestry , Hainan University/Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources , Haikou , Hainan 570228 , China)

Abstract: The mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade pathway is a signaling pathway widely present in eukaryotic organisms. Based on cassava genomic data , a comprehensive identification and phylogenetic tree analysis of mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MKK) family members in cassava was carried out by bioinformatics methods. At the same time , the expression pattern of each gene of the MKK family was analyzed through hormone treatment and pathogen inoculation. The results showed that cassava encoded 11 MKK genes , which were distributed on chromosomes 3 , 4 , 6 , 10 , 12 , 16 , and 17 of cassava. The expression analysis showed that MKKs were responsive to ABA , JA and pathogen signal but not sensitive to ACC signal , of which *MKK4* , *MKK5* , *MKK8* , *MKK9* and *MKK11* may be involved in cassava-related pathogens defense pathways and hormone signaling pathways.

Keywords: Cassava; MKK gene; identification; expression analysis

(责任编辑: 钟云芳)