



葡萄 MAPK 基因家族鉴定及逆境胁迫下的表达分析

马宗桓,黄青勇,李艳梅,李文芳,毛娟,陈佰鸿

(甘肃农业大学 园艺学院,兰州 730070)

摘要 探究葡萄 MAPK 家族成员的特性及潜在功能,为葡萄抗逆基因资源的挖掘和利用提供理论依据。本研究克隆获得葡萄 MAPK 基因家族成员并对其进行生物信息学分析,根据基因芯片数据分析各成员的组织表达特征,结合 qRT-PCR 明确其对非生物胁迫的响应情况。结果表明,葡萄中共获得 43 个 MAPK 成员,分别命名为 *VvMAPK1*~*VvMAPK43*,分布于 15 条染色体上,其中有 6 个成员集中分布于 18 号染色体上,5 个分布于 5 号染色体上。氨基酸大小为 114~1 520 aa, *VvMAPK15* 编码的氨基酸序列最长,为 1 520 个氨基酸残基, *VvMAPK23* 编码的氨基酸序列最短,为 114 个。相对分子量集中为 12.26~16.70 ku,等电点为 4.94~10.01。芯片数据分析发现,经 ABA 处理后, *VvMAPK5*、*VvMAPK7* 和 *VvMAPK13* 的表达量明显下调,在盐、PEG 和低温处理下, *VvMAPK6*、*VvMAPK9* 和 *VvMAPK13* 的表达量明显上调;不同成员在不同组织以及同一组织的不同生长阶段表达水平差异显著。qRT-PCR 分析发现,大多数 *VvMAPK* 家族成员受到 200 mmol·L⁻¹ NaCl 的诱导,表达水平较对照上调显著, *VvMAPK9*、*VvMAPK27*、*VvMAPK29* 和 *VvMAPK38* 在 500 μmol·L⁻¹ ABA、200 mmol·L⁻¹ NaCl 和 10% PEG 处理后均上调表达显著,对 3 种非生物胁迫的响应强烈。研究结果表明,葡萄 MAPK 家族成员在不同非生物胁迫下存在不同的潜在功能,为葡萄基因改良和遗传育种提供理论基础。

关键词 葡萄;MAPK;生物信息学分析;逆境胁迫;qRT-PCR

中图分类号 S663.1

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2022)08-0969-12

植物促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)是细胞信号转导中极为重要的一类蛋白激酶,含有 11 个高度保守的亚结构域^[1]。MAPK 是信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要传递者,所有的真核细胞都能表达 MAPK,能被不同的细胞外刺激,如细胞因子、神经递质、激素、细胞应激及细胞黏附^[2]。MAPK 信号通路一般包括功能相互关联的 3 个蛋白激酶:促分裂原活化蛋白激酶激酶激酶(MAPK/MAP3K/MEKK)、促分裂原活化蛋白激酶激酶(MAPK/MAP2K/MAKK)和促分裂原活化蛋白激酶(MAPK/MPK)。研究表明 MAPKKs、MAPKKs 和 MAPKs 都是多基因家族。例如,拟南芥基因组中含有 20 个 MAPK,10 个 MAPKK,80 个 MAPKKK 基因^[3-4]。MAPKKK 通常作用于 MKK 的 S/T-xxxxx-S/T(S、T 和 x

分别表示丝氨酸、苏氨酸和任意氨基酸)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,MAPK 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进行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,从而促使细胞、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^[2-4]。

MAPK 信号途径在植物响应生物和非生物胁迫中发挥着重要作用^[5],例如拟南芥中,*AtMPK1* 和 *AtMPK4* 参与调节系统抗性^[6-7],烟草中,MAPK 基因能被各种生物胁迫和防御激素所激活^[8]。水稻中,*OsBWMK1*、*OsMAPK3*、*OsMAPK5* 和 *OsMPK8* 被证实与抗病性、激素信号

收稿日期:2021-05-26 修回日期:2021-09-10

基金项目:甘肃省青年科技基金计划项目(21JR7RA838);国家自然科学基金(32160685);甘肃农业大学伏羲青年英才计划项目(GAUfx-04Y05)。

第一作者:马宗桓,男,讲师,研究方向为果树逆境生理与生长调控。E-mail:mazh@gsau.edu.cn

通信作者:陈佰鸿,男,教授,研究方向为果树逆境生理与生长调控。E-mail:bhch@gsau.edu.cn

及非生物胁迫相关^[9-10]。紫花苜蓿中, MAPK 级联反应能被真菌诱导子激活, 也参与非生物胁迫响应^[11]。

本研究拟对葡萄 MAPK 基因家族进行生物信息学及不同非生物胁迫下的表达水平分析, 以期为葡萄抗逆基因的筛选提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与处理

试验材料为保存在甘肃农业大学果树生理与生物技术实验室的‘黑比诺’葡萄(*Vitis vinifera* Pinot noir)试管苗, 2021 年 3 月将保存试管苗的单芽茎段接种于 GS 液体培养基中, 培养基添加 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA, pH 5.8~6.0, 温度 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}/20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (光照/黑暗), 光周期 16 h/8 h(光照/黑暗)。采用纸桥法进行固定, 培养 30 d 后, 试管苗高度达到 12 cm 左右, 挑选生长状况一致且无污染的葡萄试管苗作为试验材料进行处理。处理方式为小心倒出原培养基, 再重新分别加入 50 mL 含 10% PEG、 $500 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 和 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 GS 液体培养基, 每个处理设置 3 组重复, 对照加入等体积液体培养基, 处理 24 h 后提取试管苗总 RNA。

1.2 葡萄 MAPK 基因家族序列数据获取

从拟南芥基因组数据库 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>)中下载拟南芥 MAPK 基因的氨基酸序列; 从水稻基因组网站 RGAP(<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>)下载水稻的氨基酸序列。将已获得的拟南芥和水稻的氨基酸序列作为诱饵序列在葡萄基因组数据库 (<https://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>)中进行 Blat-Search, 搜索得到葡萄 MAPK 基因, 然后通过 SMART 网站 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和 Pfam 网站 (<http://pfam.xfam.org/>)确认是否含有 MAPK 保守结构域, 去除结构域缺失或不完整的序列, 从而确定最终的候选基因。下载基因的全长, CDS 序列, 氨基酸序列。

1.3 葡萄 MAPK 家族成员生物信息学分析

利用 ExPASy 数据库 (<https://web.expasy.org/protparam/>)中的 ProtParam 工具进行蛋白质的理论等电点、氨基酸大小、分子量等基本信息分析; 利用 MapInspect 软件进行基因染色体上的位置分析。利用 MEGA 7.0 软件进行葡萄

MAPK 家族成员的进化分析; 运用 Predict Protein (<http://www.predictprotein.org/signin#>)在线分析蛋白质二级结构域; 在线软件 GSDS 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)进行基因结构分析; 使用 DNAMAN 进行结构域序列多重比对。

1.4 葡萄 MAPK 家族基因芯片表达模式分析

利用 PLEXdb 软件 (<http://www.plexdb.org/index.php>)进行 MAPK 家族 RNA-Seq 数据获得, 以核酸为探针探索出相似度最高 Affymetrix Gene Chip 16K 基因 ID, 然后利用检索到的 ID(例如: 1622318 -at)在 Excel 中分别提取各成员在盐、PEG、冷害以及 ABA 胁迫下的 RNA-Seq 数据, 再对数据进行 ln 函数转换。最后使用 Heml1.0.3.7 软件进行热图制作。组织特异性表达数据来自平台 (GPL13936 NimbleGen 090918 *Vitis vinifera* exp HX12 [090918_Vitus_exp])(登录号: GSE36128), 选取的数据来自葡萄不同时期的器官, 利用 TBtools 绘制热图。

1.5 葡萄 MAPK 家族成员 qRT-PCR 分析

将葡萄 MAPK 基因家族的 CDS 序列提交到生工生物工程(上海)股份有限公司网站进行在线引物设计。以提取的总 RNA 为模板, 用 Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) 试剂盒进行 cDNA 第 1 链的合成, 将 $0.5 \sim 2 \text{ } \mu\text{g}$ 纯化的总 RNA 反转录成第 1 链 cDNA, 作为基因扩增及实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 的模板。其中, 试验中应用实时荧光定量 PCR 仪 (LightCycler[®]96 Real-Time PCR System, Roche, 瑞士), 使用 SYBR Green I (TaKaRa) 试剂盒。以葡萄 *GAPDH* 基因为内参, 扩增体系含 $2 \text{ } \mu\text{L}$ cDNA, $0.8 \text{ } \mu\text{L}$ 上、下游引物 (表 1), $10 \text{ } \mu\text{L}$ 反应 MIX, $6.4 \text{ } \mu\text{L}$ ddH₂O, 总体积 $20 \text{ } \mu\text{L}$ 。反应程序为: $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下变性 30 s, $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下退火 30 s, 40 个循环; $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s。反应结束后分析荧光值变化曲线及熔解曲线。基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

1.6 数据统计与分析

用 Origin 9.0 软件对数据进行整理和作图, 用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析, 采用最小显著差异法 (LSD) 比较不同数据组间的差异, 每个处理设置 3 个生物学重复, 显著性水平设定为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 葡萄 MAPK 家族基因理化性质分析

利用拟南芥和水稻 MAPK 氨基酸序列在葡萄基因组网站中 Blat 搜索到 43 个葡萄 MAPK 基因,分别命名为 *VvMAPK1* ~ *VvMAPK43*。葡萄 MAPK 家族氨基酸大小为 114~1 520 aa, *VvMAPK20* 氨基酸序列最长,有 1 520 个氨基酸

残基。*VvMAPK23* 氨基酸序列最短,只有 114 个氨基酸残基。分子质量为 12.26~169.94 ku。等电点集中在 4.94~10.01 之间,其中 *VvMAPK17* 的等电点最低, *VvMAPK23* 等电点最高(表 2)。葡萄 MAPK 家族成员不均匀的分布在葡萄的 15 条染色体上,其中第 5 号染色体和第 18 号染色体分布的基因最多,第 1、7、8、11 号染色体上仅有 1 个基因(图 1)。

表 1 葡萄 MAPK 家族表达分析的实时荧光定量引物
Table 1 qRT-PCR primers for expression analysis of MAPK in grape

基因 Gene	上游引物(5'→3') Forward primer	下游引物(5'→3') Reverse primer
<i>VvMAPK5</i>	AGCCACCGATTGCCCTTCC	TCCGCCCTACCAGGACTTTGTG
<i>VvMAPK7</i>	GGCGGCGATTGACCATCTGAG	TTCCCGTGAGCCACCTTCCAG
<i>VvMAPK9</i>	AGCTTGACAGTCGGATCATG	CGCACGGAATCGCCAAGG
<i>VvMAPK12</i>	ATGCTTGAACGGGATCCATCG	GTCGGTGTGCGGCTTCCATC
<i>VvMAPK13</i>	TCCGAGTCCGAGTCCGAATCAG	ATCCACCGCCGCCGATC
<i>VvMAPK16</i>	GGATATGGAGGCCCGTGGAG	CGGAGGCAACGCACGAACAG
<i>VvMAPK22</i>	TGTGCTGACGTGGACGAGAGG	TCCGCCGCCGACCAAGAC
<i>VvMAPK23</i>	TGCTGCTGCTGCTGCTTCG	CATCCTCCACCGCCTCCCTAC
<i>VvMAPK24</i>	AGAGATGGACGGCGGAGATGC	AGTGGAGGCTTCGTCGGAAGT
<i>VvMAPK25</i>	GGCACAGCAGACGGAGGAGAG	TAACGACCTGGACGCCGAGTC
<i>VvMAPK26</i>	AATTCGAGAGGGTGGAGGTCAG	CCGTTAGTCCACTTGGCACACC
<i>VvMAPK27</i>	GCTCTCCCGTCCAAGTTGTTG	CACGCCGCCGAATCTCATCC
<i>VvMAPK28</i>	GCTGCCTCAAGGTCAGATGGTG	AAATGCCCTGTCATCGCCTTGG
<i>VvMAPK29</i>	TCCCGTGTTCTACCGTCCAG	GTGGCGGAGAGCGGAGGAG
<i>VvMAPK35</i>	TCTCGACTTCGCCTCTCCTC	GCAGCCATTGACCCAGAACCG
<i>VvMAPK38</i>	AGAAAGCAGCGGCCACAACC	CGAGCCCTTTGAAGCGATGGAG
<i>VvMAPK39</i>	CACTGGTGGATGGCGTTCGTC	ATTGTTGGTGGTGGTGGTGGTG
<i>VvMAPK41</i>	AGCATCGCCGTCTTGACATTCC	TGAACCCCTCTCCTGACCACTGC
<i>VvMAPK42</i>	CCAACCGTTCCAAGCTCCTGTG	CGTGAAAGATGGCCGACTGC
<i>GAPDH</i>	TTCTCGTTGAGGGCTATTCCA	CCACAGACTTCATCGGTGACA

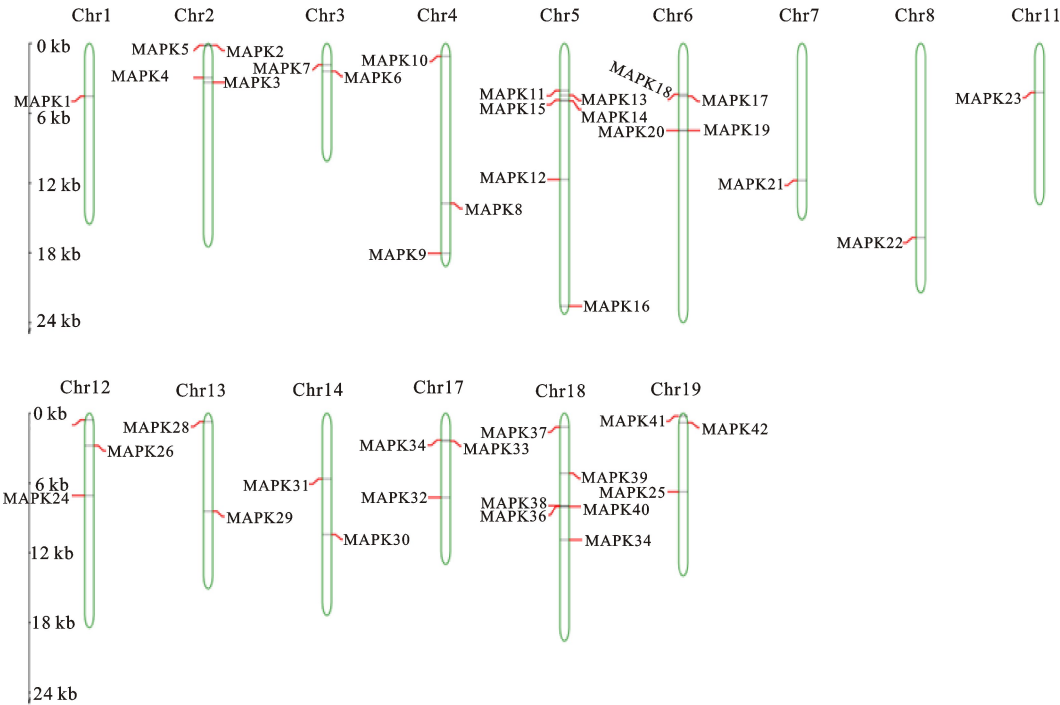


图 1 葡萄 MAPK 家族染色体定位
Fig. 1 Chromosome mapping of grape MAPK gene family

表 2 葡萄 MAPK 家族理化性质分析

Table 2 Information and physicochemical properties of grape MAPK gene family

基因 Gene	染色体定位 Chromosome location	基因登录号 Gene accession No.	氨基酸数 Amino acid	分子质量/ku Molecular mass	等电点 Isoelectric point	cDNA 长/bp Length of cDNA	分子式 Formula	基因全长/bp Full length
<i>VvMAPK1</i>	1	GSVIVT00030495001	561	59.39	7.94	1 667	C ₂₆₅₄ H ₄₁₅₃ N ₇₃₁ O ₇₇₄ S ₂₂	5 627
<i>VvMAPK 3</i>	2	GSVIVT00001151001	244	26.50	7.76	735	C ₂₃₃₉ H ₃₇₁₇ N ₆₄₇ O ₆₉₀ S ₁₇	3 698
<i>VvMAPK 2</i>	2	GSVIVT00002553001	372	42.46	5.86	1 595	C ₁₈₉₆ H ₂₉₅₃ N ₅₁₇ O ₅₆₂ S ₁₅	6 542
<i>VvMAPK 5</i>	2	GSVIVT00002554001	480	52.18	5.31	1 466	C ₇₃₇₅ H ₁₁₃₅₈ N ₁₉₆₂ O ₂₁₁₉ S ₈₁	7 280
<i>VvMAPK 4</i>	2	GSVIVT00000416001	488	55.01	5.51	2 022	C ₂₅₀₅ H ₃₈₉₃ N ₇₀₃ O ₇₅₉ S ₃₀	7 659
<i>VvMAPK 7</i>	3	GSVIVT00036147001	397	43.77	8.2	2 336	C ₁₇₈₆ H ₂₈₇₂ N ₅₂₄ O ₅₆₃ S ₁₈	6 133
<i>VvMAPK 6</i>	3	GSVIVT00036214001	500	56.46	5.54	1 946	C ₅₂₄ H ₈₅₆ N ₁₆₈ O ₁₆₄ S ₄	7 804
<i>VvMAPK 8</i>	4	GSVIVT00036900001	368	42.71	7.99	1 401	C ₁₉₂₁ H ₃₀₀₈ N ₅₂₄ O ₅₃₅ S ₂₂	3 283
<i>VvMAPK 9</i>	4	GSVIVT00034808001	409	45.22	8.95	1 785	C ₁₁₈₁ H ₁₈₂₉ N ₃₂₃ O ₃₅₈ S ₇	6 317
<i>VvMAPK 10</i>	4	GSVIVT00032212001	840	93.83	5.25	5 227	C ₄₆₇₈ H ₇₄₁₁ N ₁₃₃₅ O ₁₄₈₉ S ₃₈	13 170
<i>VvMAPK 16</i>	5	GSVIVT00034702001	398	45.76	5.5	1 609	C ₂₀₅₆ H ₃₁₈₄ N ₅₅₂ O ₅₉₇ S ₁₈	6 407
<i>VvMAPK 11</i>	5	GSVIVT00019886001	567	64.26	8.57	2 127	C ₂₈₇₀ H ₄₄₉₅ N ₇₉₇ O ₈₃₁ S ₂₅	8 367
<i>VvMAPK 13</i>	5	GSVIVT00019932001	696	76.90	6.63	2 246	C ₃₃₈₀ H ₅₃₅₃ N ₉₄₉ O ₁₀₄₁ S ₃₀	10 753
<i>VvMAPK 14</i>	5	GSVIVT00019971001	787	88.05	5.64	2 364	C ₃₉₂₆ H ₆₁₅₇ N ₁₀₅₅ O ₁₁₆₉ S ₃₇	12 344
<i>VvMAPK 12</i>	5	GSVIVT00020465001	1 106	123.20	5.41	3 451	C ₂₅₇₀ H ₄₀₀₄ N ₇₁₂ O ₇₉₅ S ₃₃	16 986
<i>VvMAPK 15</i>	5	GSVIVT00019966001	1 520	169.94	6.86	4 563	C ₇₅₇₇ H ₁₁₉₂₄ N ₂₀₃₆ O ₂₂₃₀ S ₈₅	23 852
<i>VvMAPK 19</i>	6	GSVIVT00024071001	244	26.47	8.7	735	C ₁₁₆₇ H ₁₈₅₂ N ₃₃₈ O ₃₄₀ S ₁₃	3 710
<i>VvMAPK 20</i>	6	GSVIVT00024072001	381	41.31	7.09	1 999	C ₂₄₁₆ H ₃₈₀₅ N ₆₇₁ O ₇₃₇ S ₃₀	5 767
<i>VvMAPK 17</i>	6	GSVIVT00024447001	371	42.53	4.94	1 463	C ₁₉₁₃ H ₂₉₉₂ N ₄₉₂ O ₅₆₇ S ₁₈	4 135
<i>VvMAPK 18</i>	6	GSVIVT00024457001	375	43.11	5.64	1 605	C ₂₃₂₃ H ₃₆₁₀ N ₆₁₈ O ₇₀₉ S ₂₀	6 029
<i>VvMAPK 21</i>	7	GSVIVT00019504001	353	38.84	5.03	1 062	C ₁₁₆₇ H ₁₈₅₂ N ₃₃₈ O ₃₄₀ S ₁₃	5 356
<i>VvMAPK 22</i>	8	GSVIVT00021674001	777	86.42	6.22	2 942	C ₉₇₉ H ₁₅₃₇ N ₂₆₃ O ₂₇₄ S ₈	12 051
<i>VvMAPK 23</i>	11	GSVIVT00016863001	114	12.26	10.01	345	C ₅₂₄ H ₈₅₆ N ₁₆₈ O ₁₆₄ S ₄	1 716
<i>VvMAPK 24</i>	12	GSVIVT00025896001	420	46.73	5.06	1 263	C ₂₀₅₂ H ₃₁₇₉ N ₅₆₉ O ₆₅₀ S ₁₆	1 263
<i>VvMAPK 25</i>	12	GSVIVT00027289001	610	68.95	9.12	2 018	C ₃₀₈₅ H ₄₈₉₅ N ₈₆₇ O ₈₈₄ S ₂₁	7 977
<i>VvMAPK 27</i>	12	GSVIVT00018914001	610	68.95	9.12	2 018	C ₃₀₈₅ H ₄₈₉₅ N ₈₆₇ O ₈₈₄ S ₂₁	9 752
<i>VvMAPK 26</i>	12	GSVIVT00018740001	815	91.32	5.99	2 838	C ₃₉₉₂ H ₆₃₆₅ N ₁₁₄₁ O ₁₂₂₉ S ₄₁	12 768
<i>VvMAPK 28</i>	13	GSVIVT00029318001	374	40.38	6.67	1 125	C ₁₇₅₆ H ₂₈₃₆ N ₅₀₆ O ₅₄₆ S ₁₉	1 953
<i>VvMAPK 29</i>	13	GSVIVT00034993001	755	84.83	8.59	2 885	C ₃₇₈₀ H ₅₉₀₁ N ₁₀₆₅ O ₁₁₀₀ S ₃₀	11 876
<i>VvMAPK 31</i>	14	GSVIVT00031090001	190	21.63	8.67	1 002	C ₄₁₆₅ H ₆₅₆₉ N ₁₁₄₃ O ₁₂₆₃ S ₃₀	3 061
<i>VvMAPK 30</i>	14	GSVIVT00021020001	461	52.49	8.73	1 386	C ₂₃₃₉ H ₃₇₁₇ N ₆₄₇ O ₆₉₀ S ₁₇	7 410
<i>VvMAPK 33</i>	17	GSVIVT00017805001	586	66.52	6.74	1 889	C ₁₉₂₁ H ₃₀₀₈ N ₅₂₄ O ₅₃₅ S ₂₂	9 327
<i>VvMAPK 32</i>	17	GSVIVT00016287001	691	76.88	9.26	2 278	C ₃₃₈₀ H ₅₃₄₆ N ₉₉₀ O ₁₀₂₂ S ₂₁	6 626
<i>VvMAPK 34</i>	17	GSVIVT00017808001	977	107.40	5.22	2 934	C ₂₆₉₃ H ₄₂₄₂ N ₇₇₂ O ₈₁₆ S ₁₈	14 951
<i>VvMAPK 35</i>	18	GSVIVT00014559001	371	42.53	7.19	1 945	C ₁₉₁₀ H ₃₀₀₄ N ₅₁₄ O ₅₄₁ S ₂₂	3 030
<i>VvMAPK 39</i>	18	GSVIVT00015148001	468	51.22	9.05	1 407	C ₂₂₃₇ H ₃₆₅₇ N ₆₅₃ O ₆₆₈ S ₂₆	7 241
<i>VvMAPK 37</i>	18	GSVIVT00015561001	508	56.96	5.77	1 527	C ₂₄₈₇ H ₃₈₃₉ N ₆₉₁ O ₇₅₉ S ₂₈	7 890
<i>VvMAPK 40</i>	18	GSVIVT00014893001	773	86.96	5.7	2 322	C ₃₈₇₀ H ₅₉₄₆ N ₁₀₃₈ O ₁₁₆₀ S ₄₃	12 057
<i>VvMAPK 36</i>	18	GSVIVT00014890001	792	88.75	8.25	2 379	C ₁₇₀₇ H ₂₆₂₈ N ₄₇₂ O ₅₃₁ S ₁₈	12 418
<i>VvMAPK 38</i>	18	GSVIVT00014898001	1 456	164.01	8.08	4 371	C ₇₃₇₅ H ₁₁₃₅₈ N ₁₉₆₂ O ₂₁₁₉ S ₈₁	22 895
<i>VvMAPK 41</i>	19	GSVIVT00027929001	623	71.03	9.27	2 123	C ₃₂₀₀ H ₅₀₆₂ N ₈₈₀ O ₉₁₂ S ₁₈	22 125
<i>VvMAPK 42</i>	19	GSVIVT00002067001	1 121	124.21	5.14	3 615	C ₅₄₄₆ H ₈₅₅₃ N ₁₅₀₁ O ₁₇₃₆ S ₄₃	17 279
<i>VvMAPK 43</i>	UN	GSVIVT00037684001	569	61.07	9.13	1 707	C ₂₆₉₃ H ₄₂₄₂ N ₇₇₂ O ₈₁₆ S ₁₈	4 218

2.2 葡萄 VvMAPK 家族基因结构与进化分析

葡萄 MAPK 基因结构分析表明,43 个 VvMAPK 基因内含子和外显子含量差异较大,整个基因家族的外显子数在 1 到 17 个不等。其中 10 个基因不含有上游和下游基因序列,分别是 VvMAPK5、VvMAPK8、VvMAPK15、VvMAPK28、VvMAPK30、VvMAPK37、VvMAPK38、VvMAPK39、VvMAPK40 和 VvMAPK43。7 个基因仅含有一个外显子,分别是 VvMAPK3、VvMAPK14、VvMAPK21、

VvMAPK23、VvMAPK24、VvMAPK25 和 VvMAPK36(图 2)。利用 MEGA 7.0 构建系统进化树,结果如图 3 所示,葡萄 MAPK 家族可分为 2 个亚族,第 I 亚族共有 10 个成员,第 II 亚族有 33 个成员。其中 VvMAPK1 和 VvMAPK33、VvMAPK24 和 VvMAPK25、VvMAPK30 和 VvMAPK32 的亲缘关系较为紧密。VvMAPK29 和 VvMAPK22、VvMAPK34 和 VvMAPK10 亲缘关系较近。

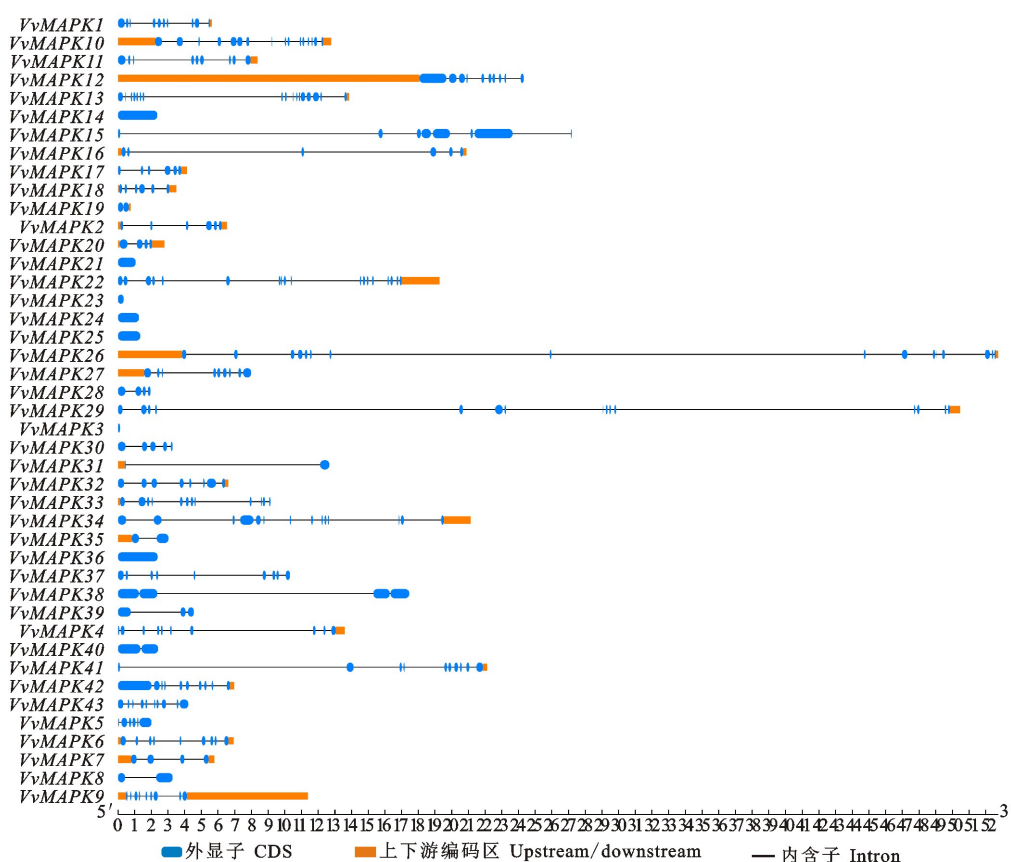


图 2 葡萄 MAPK 家族基因结构分析

Fig. 2 Gene structure analysis of grape MAPK family

2.3 葡萄 MAPK 家族成员基因芯片数据分析

基因芯片表达分析发现,经 ABA 处理后, VvMAPK5、VvMAPK7 和 VvMAPK13 基因的表达量明显下调表达,而其他基因表达量不太明显。当在盐、PEG、低温处理条件下, VvMAPK6、VvMAPK9 和 VvMAPK13 的表达量明显上调; VvMAPK1 的表达量明显下调。此外,不同时间的逆境胁迫对葡萄 MAPK 基因家族的表达存在不同的影响。如 VvMAPK5、VvMAPK6 和 VvMAPK7 在盐和 PEG 处理 24 h

之后的表达量明显高于 CK1(图 4)。

从葡萄 eFP 浏览器数据库中搜索得到 43 个葡萄 MAPK 基因,用 TBtools 将这些基因在不同组织的不同生长阶段的表达进行可视化作图(图 5)。总体来看, VvMAPK 在不同组织以及不同组织的不同生长阶段存在显著的表达差异,其中 VvMAPK17、VvMAPK14、VvMAPK15 和 VvMAPK28 在结果时期的叶片中表达量最高,预示这些基因可能在葡萄果实发育中起到重要作用。VvMAPK15、VvMAPK23、VvMAPK24、

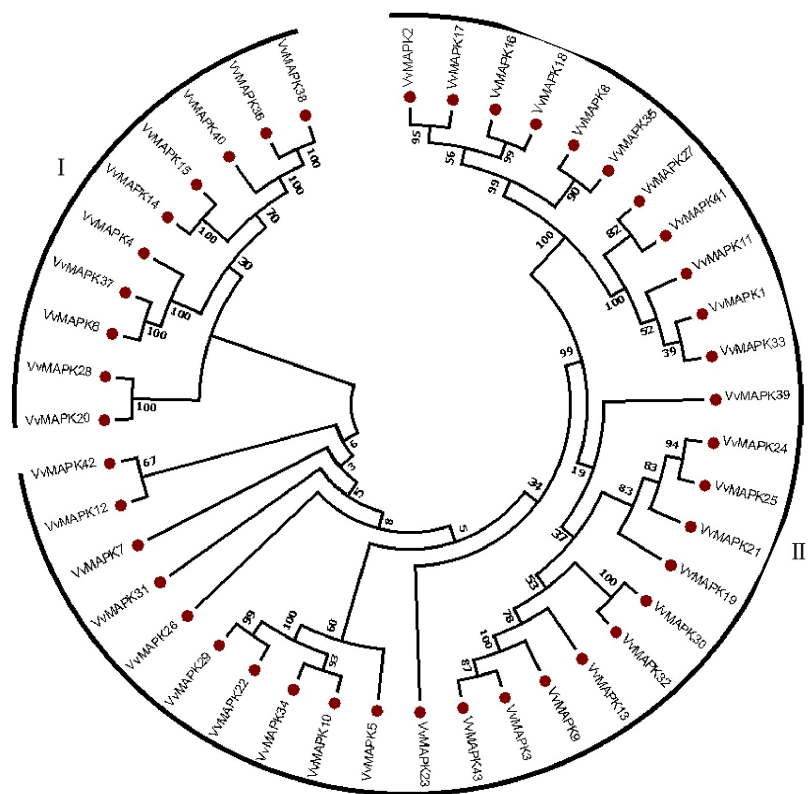


图 3 葡萄 MAPK 家族成员进化分析

Fig. 3 Evolution analysis of grape MAPK gene family

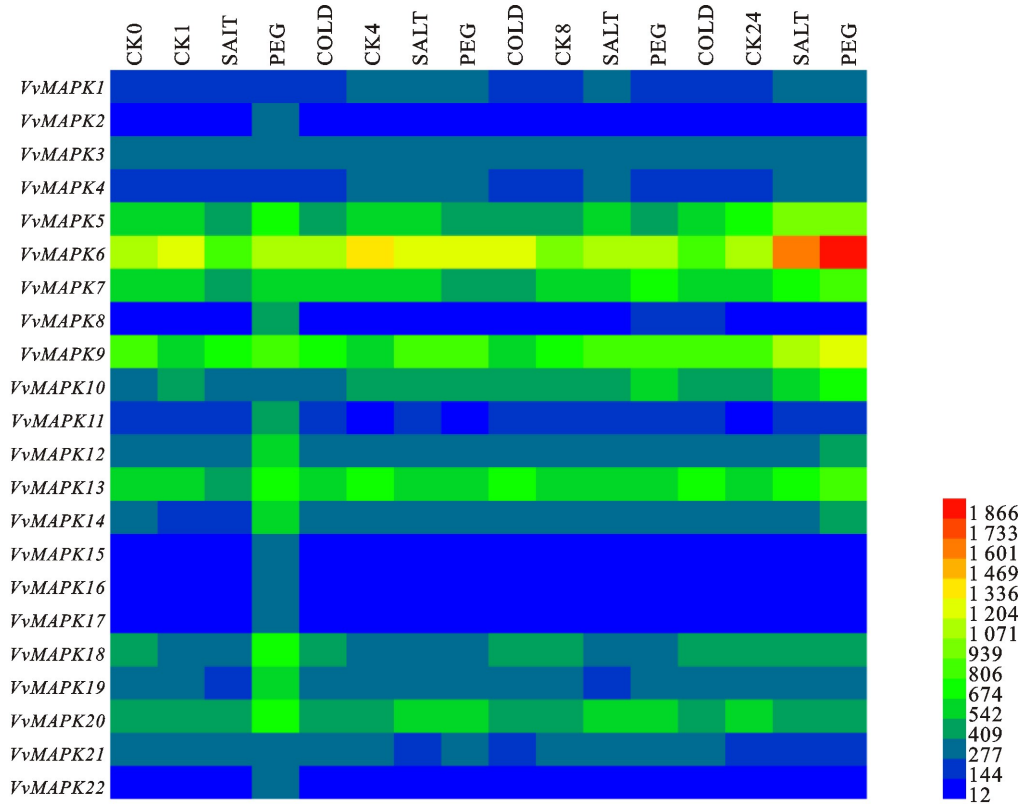


图 4 非生物胁迫下葡萄 MAPK 基因表达谱

Fig. 4 Expression profile of MAPK gene in *Vitis vinifera*

VvMAPK25 和 *VvMAPK36* 在衰老的叶片中表达量较高, *VvMAPK22*、*VvMAPK19*、*VvMAPK9* 和 *VvMAPK37* 的表达量随着种子的发育显著增高,表明这些基因在葡萄种子发育过程中可能发挥重要作用。此外,在葡萄茎的发育过程中, *VvMAPK4*、*VvMAPK16*、*VvMAPK18*、*VvMAPK20* 的表达显著升高。大多数基因在发育过程中不同组织的表达水平相对较低。

2.4 葡萄 MAPK 基因顺势作用元件分析

为了分析葡萄 *VvMAPK* 基因家族可能参与的生物学调控,对该基因家族的起始密码子上游

2 kb 序列进行分析。发现 *VvMAPK* 基因的启动子中均含有不同类型的顺式作用元件,分别有响应激素信号、干旱、低温、光照的顺式作用元件,并且 43 个基因所分布的作用元件较为均匀。其中响应光信号的作用元件在所有基因中分布相对均匀。有 5 种激素相关的顺式作用元件在 *VvMAPK* 基因家族的启动子中鉴定出来,其中 *VvMAPK18*、*VvMAPK19* 和 *VvMAPK20* 中响应 ABA 的作用元件分布较为集中,响应 IAA 的元件多集中分布在上游 1 500~2 000 bp 的基因序列中(图 6)。

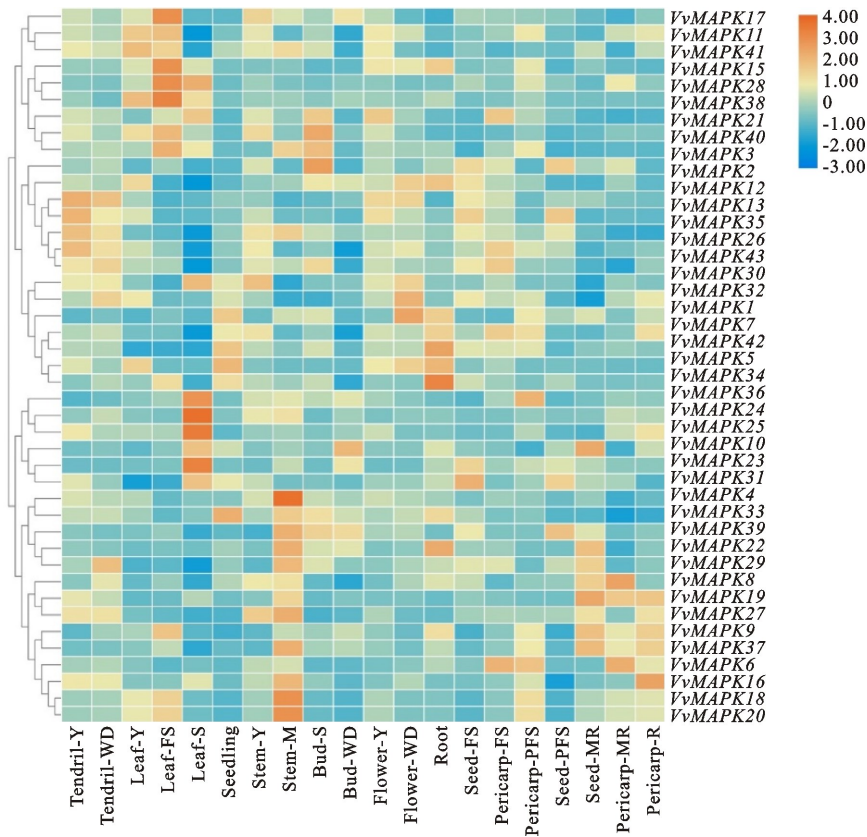


图 5 葡萄 MAPK 基因组织特异表达谱

Fig. 5 Tissue specific expression profile of MAPK gene in grape

2.5 葡萄 MAPK 基因的实时荧光定量分析

VvMAPK 基因家族各成员受 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 和 10% PEG 的诱导,各处理间表达量具有明显的差异, *VvMAPK9*、*VvMAPK27* 和 *VvMAPK29*、*VvMAPK38* 和 *VvMAPK42* 分别在 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 和 10% PEG 处理后表达水平显著上调, *VvMAPK42* 在 10% PEG 处理后表达水平上调最为显著,为 CK 的 5.5 倍,其他几个成员在 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理后表

达水平上调显著, *VvMAPK27* 和 *VvMAPK38* 分别为 CK 的 3 500 倍和 140 倍。 *VvMAPK5*、*VvMAPK12*、*VvMAPK13*、*VvMAPK23*、*VvMAPK24*、*VvMAPK26*、*VvMAPK28*、*VvMAPK35*、*VvMAPK39* 和 *VvMAPK41* 对 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫反映强烈,与对照相比,显著上调表达, *VvMAPK7* 在 10% PEG 处理后上调表达显著。 *VvMAPK9*、*VvMAPK12*、*VvMAPK27*、*VvMAPK29*、*VvMAPK38*、*VvMAPK39* 和 *VvMAPK42* 在 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

ABA 处理后相比对照上调表达显著,而 *VvMAPK5*、*VvMAPK7* 和 *VvMAPK23* 表达水平显著下调。*VvMAPK13*、*VvMAPK24*、

VvMAPK26、*VvMAPK35* 和 *VvMAPK41* 在 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 和 10% PEG 处理后表达均显著下调(图 7)。

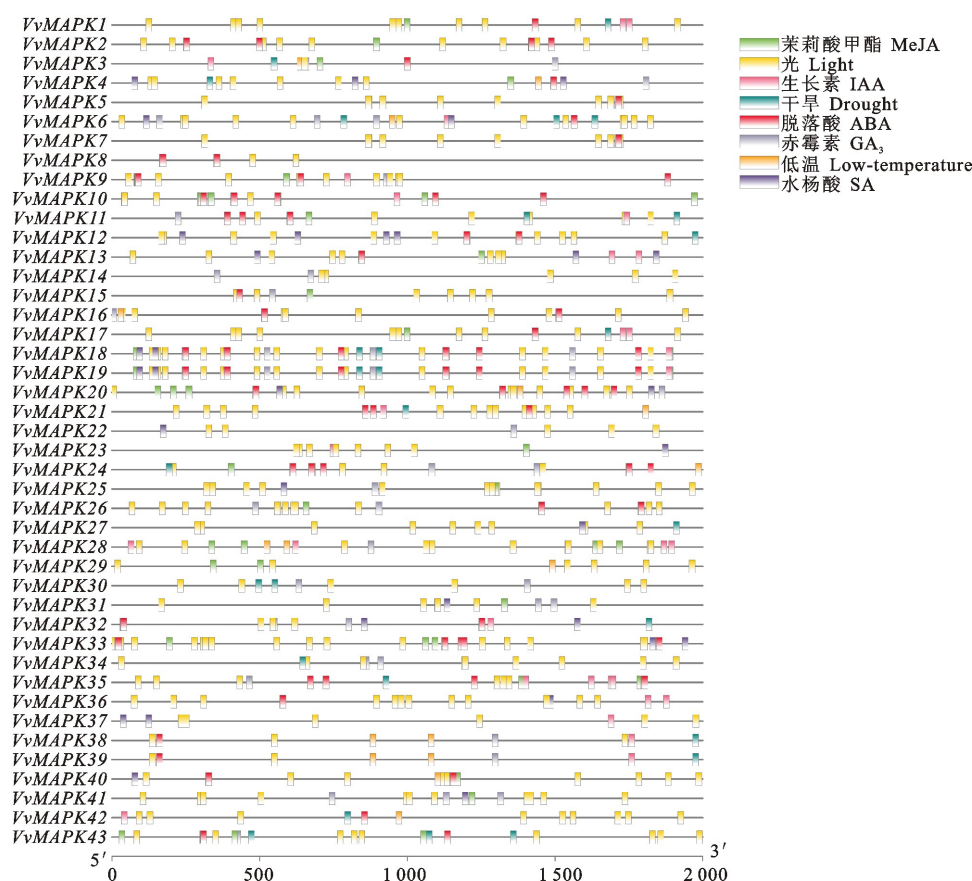


图 6 葡萄 MAPK 基因顺势作用元件

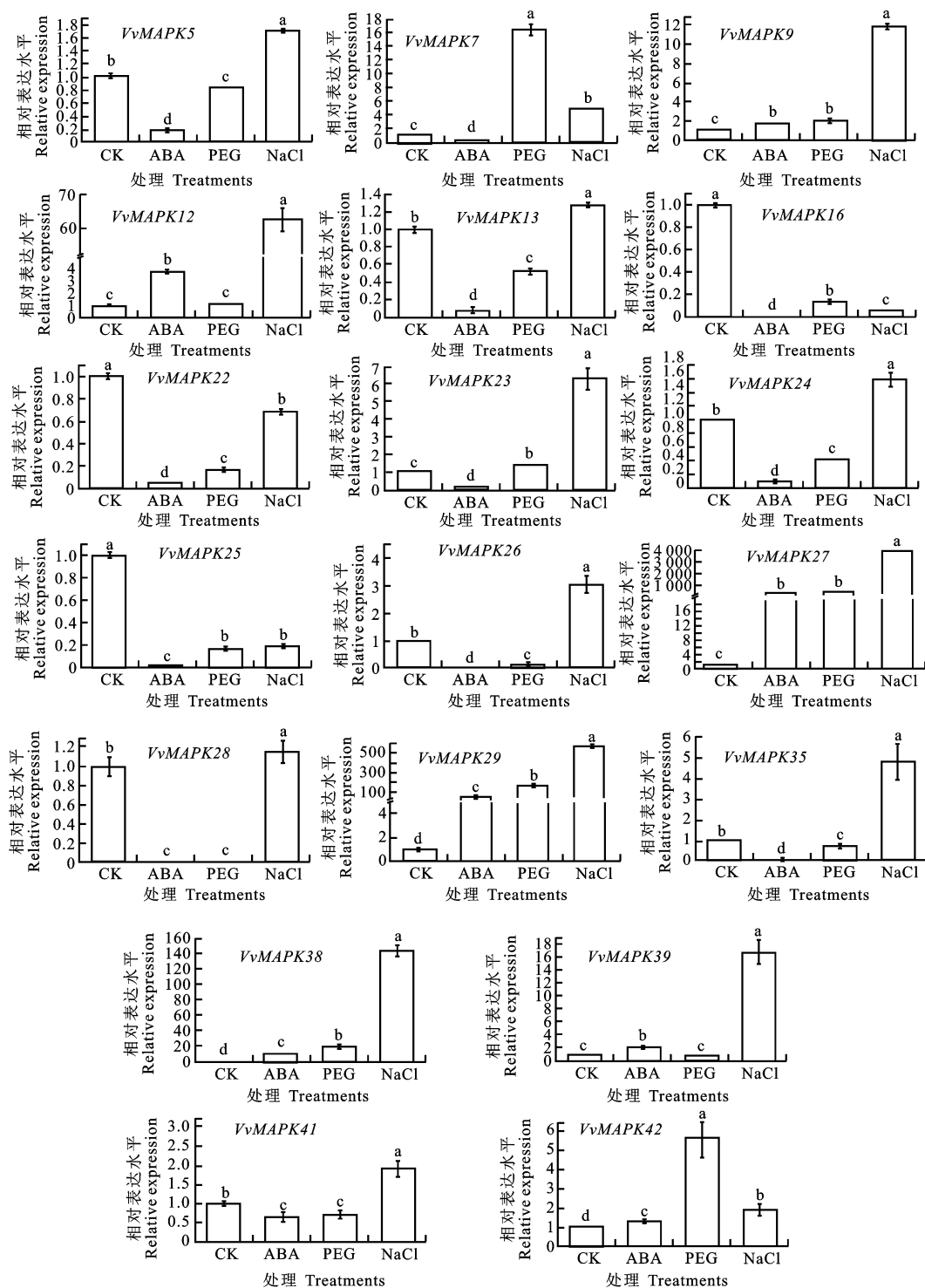
Fig. 6 Expression profile of MAPK gene in *Vitis vinifera*

3 讨论与结论

MAPK 基因还有一个 MAPK 级联途径,包括 MAPKKK (MAP3K 或 MEKK)、MAPKK (MAP2K 或 MKK 或 MEK)、MAPK (MPK) 3 组成员,是真核生物中广泛存在且高度保守的信号转导途径,参与植物细胞分化与发育^[12-13]、成熟、激素信号转导及免疫等过程^[14-15]。同时,响应多种生物与非生物胁迫^[16-17]。本研究通过已知拟南芥和水稻 MAPK 蛋白序列从葡萄基因组数据库中同源搜索到 43 个 *VvMAPK* 基因,而基因结构和进化树分析显示这些成员可以归到 2 个亚族。不同成员在细胞内的定位都不一样,主要有叶绿体、细胞质、细胞核、细胞质、细胞膜上。亚细胞定位可反映出成员潜在的功能,比如定位于线粒体中的 MAPK 主要用于清除脂肪酸 β 氧化物产生

的过氧化氢,而定位于叶绿体中的 MAPK 主要用于保护光和活性氧免受活性氧的危害^[18]。葡萄 MAPK 蛋白主要在叶绿体、线粒体和细胞核中进行表达,因此说明这个 MAPK 基因家族主要集中在光合作用,呼吸作用代谢比较强的器官当中。

植物 MAPK 基因在不同的器官和组织中呈现出特定的时空表达特性,Zhang 等^[19]从葡萄叶片分离到一个受高温胁迫的 MAPK (*VvMPK6*) 基因,并在根、茎、叶、花、果实和种子中均有表达。辣椒 *CaMPK9* 在叶中的表达水平高于其他器官^[1];棉花中 *GbMPK3* 在根、花瓣、花药和纤维中呈现高表达,而在叶片中则几乎检测不到^[20]。燕山葡萄中 *VyMAPK2* 主要在根中表达,*Vy-MAPK3* 主要在叶中表达^[18]。本研究中 *VvMAPK17*、*VvMAPK14*、*VvMAPK15* 和 *VvMAPK28* 在结果时期的叶片中表达量最高,



不同小写字母代表不同处理间基因表达水平的显著差异 ($P < 0.05$)

Different lowercase letters indicate significant differences of gene expression levels under different treatments

图 7 葡萄 MAPK 基因家族荧光定量表达分析

Fig. 7 Fluorescence quantitative expression analysis of MAPK gene family in *Vitis vinifera*

VvMAPK15、*VvMAPK23*、*VvMAPK24*、*VvMAPK25* 和 *VvMAPK36* 在衰老的叶片中表达量较高, *VvMAPK22*、*VvMAPK19*、*VvMAPK9* 和 *VvMAPK37* 的表达量随着种子

的发育显著增高,暗示不同成员在器官发育中参与了相关的生理活动。

植物体本身具有一些特异性方面相关的调控机制,通过信号方式,调控一系列相关抗性基因的

表达,从而可以提高植物在抵御逆境胁迫中的能力^[21]。研究表明, *VvMPK6* 基因在植物的生长发育过程中会受到极端环境温度、干旱、盐害以及渗透胁迫等非生物胁迫的相关调控^[19]。拟南芥中, NaCl 处理能在短时间内激活 *AtMPK6* 基因, 增强植物的抗盐性^[22]。Singh 等^[23] 发现外源生长素及细胞分裂素处理可以诱导水稻 *OsMAPKK3/6* 和 *OsMAPK3/6* 基因的表达。本研究对葡萄试管苗进行非生物胁迫处理, 研究了 MAPK 家族成员的响应情况。对随机选取的 19 个葡萄 MAPK 基因家族成员进行非生物胁迫表达分析, 发现大多数成员均对 NaCl 胁迫反应敏感, *VvMAPK5*、*VvMAPK12*、*VvMAPK13*、*VvMAPK23*、*VvMAPK24*、*VvMAPK26*、*VvMAPK28*、*VvMAPK35*、*VvMAPK39* 和 *VvMAPK41* 对 200 mmol · L⁻¹ NaCl 胁迫反映强烈, 与对照相比, 上调表达显著, *VvMAPK27* 和 *VvMAPK38* 分别为 CK 的 3 500 倍和 140 倍, 说明该基因家族成员在葡萄抗盐碱方面作用明显。Gang 等^[24] 发现除 *VvMAPK14*、*VvMAPK31* 和 *VvMAPK41* 外, 其他基因至少可以响应一种逆境胁迫。*VvMAPK12*、*VvMAPK1*、*VvMAPK10*、*VvMAPK17*、*VvMAPK26*、*VvMAPK32* 和 *VvMAPK21* 分别响应光和水杨酸胁迫, *VvMAPK21*、*VvMAPK18* 和 *VvMAPK19* 能够响应 9 种胁迫, *VvMAPK23* 受到光胁迫的强烈诱导。本研究中 *VvMAPK9*、*VvMAPK27* 和 *VvMAPK29*、*VvMAPK38* 和 *VvMAPK42* 在 200 mmol · L⁻¹ NaCl、500 μmol · L⁻¹ ABA 和 10% PEG 处理后表达水平均显著上调, *VvMAPK13*、*VvMAPK24*、*VvMAPK26*、*VvMAPK35* 和 *VvMAPK41* 在 500 μmol · L⁻¹ ABA 和 10% PEG 处理后表达均显著下调, 不同的基因对非生物胁迫响应也不尽相同。芯片数据显示, ABA 处理后 *VvMAPK5* 和 *VvMAPK7* 在 ABA 处理后表达量明显下调, *VvMAPK9* 敏感响应 NaCl 和 PEG 胁迫, 与本研究结果一致。*VvMAPK12*、*VvMAPK16* 和 *VvMAPK22* 在 PEG 处理后芯片表达数据和 qRT-PCR 结果不同, 造成差异的主要原因可能与试验材料的生长状况、条件和品种有关, 本研究主要以试管苗为研究材料, 在生理状态上和室外生长的苗木有较大的差别, 从而影响到试验结果。

综上, 在葡萄基因组中检索获得 43 个 MAPK 成员, 并且大多数受到 200 mmol · L⁻¹ NaCl 的诱导, 表达水平较对照上调显著, *VvMAPK9*、*VvMAPK27*、*VvMAPK29* 和 *VvMAPK38* 在 500 μmol · L⁻¹ ABA、200 mmol · L⁻¹ NaCl 和 10% PEG 处理后均上调表达显著, 对 3 种非生物胁迫的响应强烈。

参考文献 Reference:

- [1] 吴绍华, 张世鑫, 杨署光, 等. 巴西橡胶树 *HbMCK4* 基因的克隆及表达分析[J]. 西北植物学报, 2015, 35(3): 440-446.
WU SH H, ZHANG SH X, YANG SH G, *et al.* Molecular cloning and expression of *HbMCK4* from *Henea brasiliensis* (Para Rubber Tree)[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2015, 35(3): 440-446.
- [2] QIU J L, PETERSEN M, THORGRIMSEN S, *et al.* The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses[J]. *EMBO Journal*, 2005, 24(14): 2579-2589.
- [3] SU J, ZHANG M, ZHANG L, *et al.* Regulation of stomatal immunity by interdependent functions of a pathogen-responsive MPK3/MPK6 cascade and abscisic acid[J]. *Plant Cell*, 2017, 29(3): 526-542.
- [4] SUAREZ-RODRIGUEZ M C, ADAMS-PHILLIPS L, LIU Y D, *et al.* MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in Arabidopsis plants[J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(2): 661-669.
- [5] 刘波. WRKY 转录因子 SIDRW1 和 NAC 转录因子 SISRN1 在番茄抗性反应中的功能研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
LIU B. Functional analysis of tomato WRKY transcription factor SIDRW1 and NAC transcription factor SISRN1 in the regulation of defense response [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012.
- [6] PETERSEN M, BRODERSEN P, NAESTED H, *et al.* Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance [J]. *Cell*, 2000, 103(7): 1111-1120.
- [7] ZHANG J, GAO J, ZHU Z, *et al.* MKK4/MKK5-MPK1/MPK2 cascade mediates SA-activated leaf senescence via phosphorylation of NPR1 in Arabidopsis [J]. *Plant Molecular Biology*, 2020, 102(4/5): 463-475.
- [8] ZHANG H S. Calcium-independent activation of salicylic acid-induced protein kinase and a 40-kilodalton protein kinase by hyperosmotic stress [J]. *Plant Physiology*, 2000, 122(4): 1355-1363.
- [9] HE C, FONG S, YANG D, *et al.* BWMK1, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice [J]. *Molecular Plant-Microbe Interact*, 1999, 12: 1064-1073.
- [10] DANQUAH A, ZELICOURT A D, COLCOMBET J, *et al.* The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses [J]. *Biotechnology Ad-*

- vances, 2014, 32(1):40-52.
- [11] MUNNIK T, LIGTERINK W, MESKIENE I, *et al.* Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress [J]. *Plant Journal*, 2010, 20(4):381-388.
- [12] MACHIDA Y, HINKEL kinesin, ANP MAPKKs and MKK6/ANQ MAPKK, which phosphorylates and activates MPK4 MAPK, constitute a pathway that is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2010, 51(10):1766-1776.
- [13] ZHAO F Y, HU F, ZHANG S Y, *et al.* MAPKs regulate root growth by influencing auxin signaling and cell cycle-related gene expression in cadmium-stressed rice [J]. *Environmental Science and Pollution Reserch*, 2013, 20(8):5449-5460.
- [14] 郝丽芬, 燕孟娇, 房永雨, 等. 黑胂病菌侵染过程中油菜响应基因的表达分析 (英文) [J]. 西北植物学报, 2021, 41(2):197-211.
- HAO L F, YAN M J, FANG Y Y, *et al.* Gene expression analysis of *Brassica napus* in response *Leptosphaeria biglobosa* infection progress (English) [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, 41(2):197-211.
- [15] 姜生秀, 李德禄. 植物丝裂原活化蛋白激酶级联信号转导通路研究进展 [J]. 西北植物学报, 2016, 36(6):1278-1284.
- JIANG SH X, LI D L. Research progress of Mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, 36(6):1278-1284.
- [16] MENG X, ZHANG S. MAPK cascades in plant disease resistance signaling [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2013, 51:245-266.
- [17] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants [J]. *Cell*, 2016, 167(2):313-324.
- [18] 朱自果, 张庆田, 李秀杰, 等. 燕山葡萄 MAPK 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(3):429-440.
- ZHU Z G, ZHANG Q T, LI X J, *et al.* Cloning, subcellular localization and expression analysis of MAPK genes from *Vitis yeshanensis* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, 28(3):429-440.
- [19] ZHANG M, SU J, YAN Z, *et al.* Conveying endogenous and exogenous signals: MAPK cascades in plant growth and defense [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2018, 45:1-10.
- [20] 龙 璐. 棉花丝裂原活化蛋白激酶基因 *GbMPK3* 的功能鉴定 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- LONG L. Characterization of *GbMPK3*, a mitogen-activated protein kinase gene from cotton [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014.
- [21] 武维华. 植物生理学 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 486-497.
- WU W H. Plant Physiology [M]. Beijing: Science Press, 2003: 486-497.
- [22] TEIGE M, SCHEIKL E, EULGEM T, *et al.* The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Cell*, 2004, 15:141-152.
- [23] SINGH P, MOHANTA T K, SINHA A K. Unraveling the intricate nexus of molecular mechanisms governing rice root development: OsMPK3/6 and auxin-cytokinin interplay [J]. *PLOS ONE*, 2015, 10:e0123620.
- [24] GANG W, LOVATO A, POLVERARI A, *et al.* Genome-wide identification and analysis of mitogen activated protein kinase kinase gene family in grapevine (*Vitis vinifera*) [J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14:219.

Identification of Grape MAPK Gene Family and Expression Analysis under Adversity Stress

MA Zonghuan, HUANG Qingyong, LI Yanmei, LI Wenfang,
MAO Juan and CHEN Baihong

(College of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract The function and characteristics of grapevine MAPK transcription factor family genes were explored to provide theoretical basis for utilizing grapevine stress resistance gene resources. Bioinformatics was used to analyze the physical and chemical properties, system evolution, gene chip expression, cis-acting elements, motif and expression level under stress of grapevine MAPK gene family. The results showed that 43 MAPK family genes, named as *VvMAPK1*-*VvMAPK43*, distributed on 15 chromosomes, among which 6 members were concentrated on the 18th chromosome and 5 on the 5th chromosome. The amino acid size of grapevine MAPK transcription factor family was between 114—1 520 aa, and *VvMAPK15* had the longest amino acid sequence with 1 520 amino acid residues while *VvMAPK23* had the shortest amino acid sequence, only 114 amino acid residues. The relative molecular mass concentrated in 12.26—16.70 ku. Isoelectric point was concentrated between 4.94—10.01. qRT-PCR analysis showed that *VvMAPK2*, *VvMAPK3*, *VvMAPK6* and *VvMAPK7* showed a downward trend compared with the control. *VvMAPK1*, *VvMAPK2*, *VvMAPK3*, *VvMAPK5*, *VvMAPK6* and *VvMAPK7* were all down regulated after being treated at 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA, 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl and 4 $^{\circ}\text{C}$. The microarray data showed that after ABA treatment, the expression of *VvMAPK5*, *VvMAPK7* and *VvMAPK13* genes were significantly down regulated, while under treatments of salt, PEG and low temperature, the expression of *VvMAPK6*, *VvMAPK9* and *VvMAPK13* was significantly up regulated.

Key words Grape; MAPK; Bioinformatics analysis; Abiotic stress; qRT-PCR

Received 2021-05-26

Returned 2021-09-10

Foundation item Young Science and Technology Fund Program of Gansu Province (No. 21JR7RA838); National Natural Science Foundation of China (No. 32160685); Fuxi Young Talents Project of Gansu Agricultural University (No. GAUfx-04Y05).

First author MA Zonghuan, male, lecturer. Research area: stress physiology and growth regulation of fruit trees. E-mail: mazh@gsau.edu.cn

Corresponding author CHEN Baihong, male, professor. Research area: stress physiology and growth regulation of fruit trees. E-mail: bhch@gsau.edu.cn

(责任编辑: 潘学燕 Responsible editor: PAN Xueyan)