



梁成刚,陈晴晴,石桃雄,等.普通荞麦种内丝裂原活化蛋白激酶序列片段分析[J].华南农业大学学报,2016,37(4):90-96.

普通荞麦种内丝裂原活化蛋白激酶序列分析

梁成刚, 陈晴晴, 石桃雄, 陈其蛟, 孟子烨, 陈庆富

(贵州师范大学 荞麦产业技术研究中心/贵州省荞麦工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550001)

摘要:【目的】比较普通荞麦 *Fagopyrum esculentum* 种内丝裂原活化蛋白激酶基因 (*MAPK*) 序列的差异, 研究 *MAPK* 基因序列在普通荞麦栽培进化过程中的变化。【方法】以普通荞麦的 9 个栽培品种和 3 个落花落果野生种质为材料, PCR 特异性扩增获得 *MAPK* 基因的保守片段, 对基因片段序列进行差异分析和蛋白结构预测。【结果】荞麦 *MAPK* 基因 cDNA 全长为 2 835 bp, 开放阅读框 1 827 bp, 编码 609 个氨基酸, 含有 TDY 的三肽模块, 为植物 D 组 *MAPK* 蛋白。PCR 扩增获得 12 个供试材料的 *MAPK* 序列, 其单型不变位点为 723 个, 多态位点为 70 个。9 个栽培品种间开放阅读框 (ORF) 区域无序列差异, 3 个野生种质间 ORF 区域也无序列差异。栽培品种与野生品种的 ORF 区域序列含有 8 个差异位点, 编码 3 个差异氨基酸。其中, ORF 区域第 13 位点组氨酸(H)→酪氨酸(Y)发生置换, 导致 1 个 α -螺旋构象发生变化。【结论】普通荞麦 *MAPK* 基因序列高度保守, 栽培驯化对 ORF 区域第 13 位点差异氨基酸的选择具有高度一致性。

关键词: 普通荞麦; 丝裂原活化蛋白激酶; 序列分析; 氨基酸位点; 蛋白结构
中图分类号: S517; S321 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2016)04-0090-07

Sequence analysis of mitogen-activated protein kinases of common buckwheat, *Fagopyrum esculentum*

LIANG Chenggang, CHEN Qingqing, SHI Taoxiong, CHEN Qijiao, MENG Ziyi, CHEN Qingfu
(Research Center of Buckwheat Industry Technology, Guizhou Normal University / Buckwheat Engineering Research Center of Guizhou Province, Guiyang 550001, China)

Abstract:【Objective】To identify the difference of mitogen-activated protein kinase gene (*MAPK*) sequences among intraspecific common buckwheat, *Fagopyrum esculentum*, and study the sequence change during the chronical domestication process. 【Method】The common buckwheat varieties, containing nine cultivars and three wild types with shattering habit, were selected for PCR amplification of the conservative fragments of *MAPK* gene. Sequences were analyzed and protein conformations were predicted. 【Result】The full length of buckwheat *MAPK* cDNA was 2 835 bp, the length of the open reading frame (ORF) was 1 827 bp, and 609 amino acids containing the TDY tripeptide module were encoded. The buckwheat *MARK* belonged to the group D of plant *MARK* proteins. A total of 723 invariable sites and 70 polymorphic sites in *MAPK* sequence of common buckwheat were identified in 12 tested materials. We did not find difference among the ORF sequences of nine cultivars, neither among three wild types. There were eight differential nucleotides in the ORF of *MAPK* gene which encoded three amino acid poly-

收稿日期:2015-11-04 优先出版时间:2016-06-01
优先出版网址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20160601.1353.020.html>
作者简介:梁成刚(1985—),男,助理研究员,博士,E-mail: jesselcg@163.com;通信作者:陈庆富(1966—),教授,博士, E-mail: cqf1966@163.com

基金项目:国家自然科学基金(31471562,31171609);国家燕麦荞麦现代农业产业技术体系专项(CARS-08-A4);贵州省高层次创新型人才培养对象十百千计划(2014GZ97588);贵州省荞麦工程技术研究中心项目(黔科合农G字【2015】4003号)。

morphisms between the cultivars and wild types. We found a change of α -helix conformation which was induced by transforming histidine (H) to tyrosine (Y) at the 13th site in the ORF of MARK. 【Conclusion】 The *MAPK* sequence is highly conserved and the 13th amino acid site has been highly consistently selected during the chronical process of domestication.

Key words: *Fagopyrum esculentum*; MAPK; sequence analysis; amino acid site; protein conformation

荞麦 *Fagopyrum* 起源于中国的西南地区,是我国重要的杂粮作物之一^[1]。荞麦具有食药兼用特性,营养价值丰富、药用保健效果较好^[2-3]。例如荞麦所富含的黄酮类化合物,尤其是芦丁具有明显的降血糖、降血脂和降血压功效^[4]。由于荞麦具有生育期短、耐贫瘠特性,特别适合在高寒地区种植^[5]。普通荞麦 *Fagopyrum esculentum* 又名甜荞,包含栽培和野生类型。栽培甜荞种植面积较广,在我国南北地区均有栽培。野生甜荞是栽培甜荞的祖先,主要分布于中国西南地区,特别是西藏、云南和四川,其形态与栽培甜荞非常相似,但具有落花、落果习性^[1, 6-7]。植物丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases, MAPK)是生物信号传递网络中的重要信号分子^[8-10]。MAPK 级联途径通过调节植物细胞分裂、分化及凋亡等过程,调控植株生长和发育^[9, 11-12]。不仅如此,MAPK 信号通路还在植物激素代谢以及逆境胁迫应答调控方面发挥重要作用^[11, 13-15]。高华健等^[16]研究发现 MAPK 通过调节 H_2O_2 和生长素的平衡可以调控水稻幼苗根系的生长。梁卫红等^[17]研究发现逆境胁迫如高盐、低温和脱落酸能使 *OsMAPK14* 基因表达上调,进而降低逆境对水稻生长发育的影响。此外,有研究指出 MAPK 可与 IDA (Inflorescence deficient in abscission)、HAE (受体蛋白激酶 HAESA) 和 HSL2 (HAESA-like 2) 共同作用,调控离层细胞的程序化死亡,进而参与调控植物花器官的脱落过程^[18]。目前鲜见有关荞麦 *MAPK* 基因的相关报道。本试验根据前期转录组基因测序所得到 *MAPK* 的 Unigene 序列,设计特异性引物,经 PCR 扩增测序分析普通荞麦栽培品种与野生种质间此基因片段序列的差异,以期为荞麦 *MAPK* 基因功能研究与荞麦的花果器官脱落、起源与进化等相关研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

普通荞麦:9 个栽培品种,3 个具有落花、落果习性的野生种质,均由贵州师范大学荞麦产业技术研

究中心提供(表 1)。使用 $1.25\text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 新洁尔灭溶液对种子消毒后放置于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 光照培养箱,待种子发芽后播种于含腐殖土的花盆。

表 1 供试的普通荞麦材料
Tab.1 The common buckwheat materials used in this study

编号	材料	花果脱落习性	收集地
E1	榆林甜荞	不落	陕西
E2	宁荞 1 号	不落	宁夏
E3	信农 1 号	不落	宁夏
E4	赤甜 1 号	不落	内蒙古
E5	定甜 2 号	不落	甘肃
E6	平荞 2 号	不落	甘肃
E7	威甜 1 号	不落	贵州
E8	自花甜荞	不落	贵州
E9	综甜 1 号	不落	贵州
WE1	野生甜荞 1	易落	西藏
WE2	野生甜荞 2	易落	云南
WE3	野生甜荞 3	易落	云南

1.2 PCR 扩增与测序

根据前期转录组基因测序所得到的荞麦 Unigene 序列,进行基因功能注释和数据库基因序列比对,获得荞麦 *MAPK* 序列片段。根据 *MAPK* 基因序列片段的保守区域,利用 Primer5.0 软件设计正向特异性引物 5'-GTGTTGCTCACCAGTTGGATT-3'和反向特异性引物 5'-GTCAGTGCGGTGACCTATCTT-3'。幼苗期对供试材料植株嫩叶进行取样,使用改良 CTAB 法提取 DNA,PCR 扩增参考陈晴晴等^[19]的方法。PCR 反应体系总体积为 $60\text{ }\mu\text{L}$,包含 $2 \times \text{Taq PCR MasterMix } 30\text{ }\mu\text{L}$, $5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物各 $6\text{ }\mu\text{L}$, $40\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ DNA 模板和 $\text{ddH}_2\text{O } 9\text{ }\mu\text{L}$ 。扩增反应体系为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 60 s , 退火 45 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min ,循环 35 次 ; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后送上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.3 序列分析与进化树的构建

在本地数据库(未发表)对前期转录组测序所获得的荞麦 *MAPK* 基因的 Unigene 序列进行 Nucleotide blast,获得荞麦 *MAPK* 基因的 cDNA 序列;在 NCBI

数据库 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 上使用 Nucleotide blast 对测序获得的基因片段序列进行在线比对;使用 Protein blast 进行氨基酸序列的在线比对。使用 ClustalW 软件进行多序列比对分析;使用 DNAssist2. 2 和 MEGA6 软件进行核酸和氨基酸序列差异分析;使用 MEGA6 软件构建系统进化树。在网页 (<http://swissmodel.expasy.org/workspace>) 上使用 Swiss-model 对 MAPK 片段进行蛋白质结构在线预测^[20-22]。

2 结果与分析

2.1 荞麦 MAPK 基因序列

对荞麦转录组基因测序所得到的 Unigene 进行基因功能注释和数据库基因序列比对,获得 MAPK 的 Unigene 序列。在本地基因组数据库中对该 Uni-

gene 基因序列进行 Nucleotide blast 分析,获得荞麦 MAPK 序列。生物信息学分析发现,该基因 cDNA 序列全长为 2 835 bp,碱基组成为 A 占 29.5%、C 占 20.6%、G 占 22.1%、T 占 27.8%。荞麦 MAPK 基因含有 1 个 1 827 bp 的开放阅读框 (ORF),编码 609 个氨基酸。从图 1 可知,该 ORF 区域编码的氨基酸包含 TDY 的三肽模块,为植物 D 组 MAPK 蛋白的典型结构。NCBI 数据库在线使用 Nucleotide blast 对所获得的荞麦 MAPK 基因序列进行比对。结果发现荞麦 MAPK 基因序列与陆地棉 *Gossypium hirsutum*、烟草 *Nicotiana tabacum*、可可 *Theobroma cacao* 等数十个物种上百个已知 MAPK 家族基因序列的相似性高于 70%,属于高度同源。因此,认为该基因为植物 MAPK 基因 D 组中的一员。

```
1 ATGCAGCCAGATCAACGAAGGAAGAGCCTCAAAGAACCCGAATTTTCTACTGATTATGGTGATGCCAATAGATACAAAATCTTGAAGTT
  M Q P D Q R R K S L K E P E F F T D Y G D A N R Y K I L E V
91 GTGGGGAAGGGGAGTTATGGAGTTGTTGGTGCGGCCATTGACACGCACACTGGGGAGAGGTAGCCATAAAGAAAAATAACATTTTT
  V G K G S Y G V V G A A I D T H T G E K V A I K K I N N I F
181 GAGCATAGTTCTGATGCTATGAGGATCTCTGTAAGTCAAGTTACTTAGACTTCTACGGCATCTGACATTGTTGATATTAAGCGCATC
  E H S S D A M R I L R E V K L L R L L R H P D I V D I K R I
271 ATGCTACCACCTTCCAAGAGAGACTTCAAGGACATATATGTTGTTTTGAGCTTATGGAATCTGATCTTCATCAAGTTATCAAAGCTAAT
  M L P P S K R D F K D I Y V V F E L M E S D L H Q V I K A N
361 GACGACTTGACACGGGAACACCATCAGTTTTTCTTTATCAAATGTTACGTGCACTAAATACATGCACACAGCAATGTCTATCATCGA
  D D L T R E H H Q F F L Y Q M L R A L K Y M H T A N V Y H R
451 GATCTGAAGCCAAAAATATTTTGGCCAATGCAAATGCAAAGTAAAAATATGTGATTTCTGGGCTAGCAAGAGTGGCATTTAATGATACC
  D L K P K N I L A N A N C K V K I C D F G L A R V A F N D T
541 CCTCAACTGCCTTTGCGGATTACGTTGCTACAGGTGGTACAGGGCTCAGAGTTATGTGGGTCATTTTCTCCAAGTACACACCT
  P T T A F G W T D Y V A T R W Y R A P E L C G S F F S K Y T P
631 GCAATTGATATTTGGAGCATTTGGATGTCATCTTTCGCGAGTTATTGACGGGGAAACCACTTTTCCGGTAAAAAGTGTGCCACCAAGTTG
  A I D I W S I G C I F A E L L T G K P L F P G K S V A H Q L
721 GATTTGATCACAGATCTTCTTGGGACACCTCACCTGAAACCATAGCTGGGGTCCGTAATGACAAGGCTCGTAAATACTTGTGGATATG
  D L I T D L L G T P S P E T I A G V R N D K A R K Y L L D M
811 CGGAAGAAGAAACCTGTTCCGTTTTCTACTGAAGTTTCAAATGCTGATCCCTTAGCACTACGCTGTTGGAAAGACTGTTGGCTTTTGAT
  R K K K P V P F S L K F P N A D P L A L R L L E R L L A F D
901 CCAAAGTACAGGCCAACCCGAGAGGAGGCATTGGCTGATCCTTATTTAAAGGTCTGGCTAAAATCGAGAGAGAACCTGCATGCAAAACCA
  P K Y R P T A E E A L A D P Y F K G L A K I E R E P A C K P
991 ATCTCAAAGTTAGAATTTTGAAGGCGACGTATGACTAAGGAGGACATCAGGGAACCTGATATACCGAGAGATACCTTGAACACCAT
  I S K L E F E F E R R R M T K E D I R E L I Y R E I L E H H
1 081 CCTCAGTACTCAAAGATTACATAAATGGAATGAAGGAGCAAATTTTCATATATCCTAGTGCCATTGGTCAGTTCAAGAAACAAATTTGCA
  P Q T T G L L K A D Y I I N G N E G A N F I Y P S A I G Q F K K Q F A
1 171 CATTGGAGGAGAATGYYCAAAAATGGACAGTCAACCCCTTGCGATGAAAGCATATTTACTCCCAAGATCAACTGACATCTGACATGAGT
  H L E E N S G K N G P V T P L D R K H I S L P R S T V H S S
1 261 ACAATCCCCAAAACACAGCATAACTTTTCATGCGGGACCAATTTAGAAGAGAGGAGGCTAGAAGTGTAGATCCATTTTCCGGTATT
  T I P P K P Q H N F S M R D Q F R R E E A R T V D P F S G I
1 351 TACTCCATTTACAATCACAAACCCAGGGATCCATCACAAAGCCAGGAAGAGTAGTTGGCCAATTGCCTTACGAGGCAGGAAGGAGCATG
  Y S I S Q S Q P R D P S P K P G R V V G Q L P Y E A G R S M
1 441 AAAGAGAGCTATGACGCGAGGACAACGATGAGAAATGGGTTGGTCTCTCCACAATCGGTCTACCCCAACAATTTCTTGGGCTACCATG
  K E S Y D A R T T M R N G L V P P Q S V S P H N F F G P T M
1 531 ATACCGAATCATGTCAAGCCCAACGGCATGAATGCTGATCGCCTTGATCGGGGGGTTCCCATGAACATGGCGAATCAAAATGGCCAAAGA
  I P N H V K P R D M N A D R L D R G V P M N M A N Q N G Q R
1 621 ACTGCCATTGACATCAAGTCTAACTAACCATATCCCTCAATCAATACCACCATCAAACCCAGCCAGATCCTGACCCGTTGAGCAAG
  T A I D I K S N T N P Y P L N Q Y H H Q T Q P D P D P F S K
1 711 CTCGCCATTGACGCGAAGCAGCTAATCCGAGCCAGTCGACGTTTGGCCGAGTTCGGTCCACAGCCAGTGCCATGGGAAATCACAGAAAC
  L A I D A K Q G T I R A Q S Q F G A V R S T A S A M G N H R N
1 801 ATAGGAGCTGTAAACTATGGAATGTC
  I G A V N Y G M S
```

* 标记 MAPK 典型的 TDY 结构。

图 1 荞麦 MAPK 基因的开放阅读框序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 1 The open reading frame and its coding amino acid sequence of buckwheat MAPK gene

2.2 丝裂原活化蛋白激酶的 PCR 扩增

提取普通荞麦 9 个栽培品种和 3 个野生种质植株幼嫩叶片的 DNA, 利用特征引物扩增 *MAPK* 基因序列。琼脂糖凝胶电泳检测发现, 12 个供试材料中 PCR 扩增得到的产物在约 900 bp 处产生特异性条带; 测序结果发现, E1 中产生的特异条带序列片段为 886 bp (图 2)。对序列片段进行本地数据库 Nucleotide blast 比对分析, 结果发现该片段部分序列与普通荞麦 *MAPK* 基因 cDNA 片段部分序列相似性达到 100% (图 3), 说明 PCR 扩增产物即为普通荞麦 *MAPK* 基因片段。

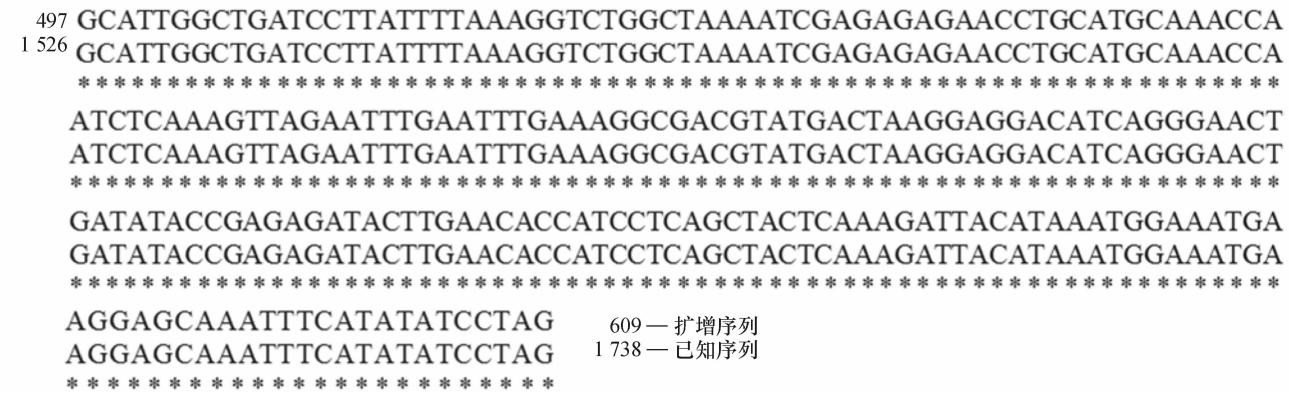


图 3 普通荞麦 DNA 序列比对结果

Fig. 3 The output of common buckwheat DNA sequence alignment

2.3 丝裂原活化蛋白激酶的进化分析

利用 DNAssist 软件对 E1 中目标片段基因序列进行分析, 结果发现该片段含有 1 个序列为 300 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 1 个 MAPK 蛋白保守结构域, 与烟草、陆地棉、桑树等 20 余个物种中上百个已知的 MAPK 家族蛋白序列相似性达 78% ~ 88%。通过 Protein blast 比对得到与普通荞麦 MAPK 蛋白片段序列相似性较高的烟草 (AFP20229.1)、陆地棉 (AJA29662.1; AAZ83349.1)、中棉 (ACC63895.1)、野芭蕉 (ABF69963.1; AIU98489.1)、苜蓿 (XP 013445445.1)、杨树 (XP 002298926.1)、花生 (ABI95363.1)、蓖麻 (XP 002528477.1)、桑树 (AIE11757.1) MAPK 蛋白片段序列。利用 MEGA6 软件对其进行系统进化分析, 从聚类图可知, 同一物种或亲缘关系较近物种的 MAPK 序列差异较小, 被聚在一起。由图 4 可知, 普通荞麦栽培品种与野生种质的 MAPK 蛋白被聚在一起, 亲缘关系近。

2.4 普通荞麦丝裂原活化蛋白激酶序列差异分析

对 12 个供试材料扩增得到的目标基因片段序

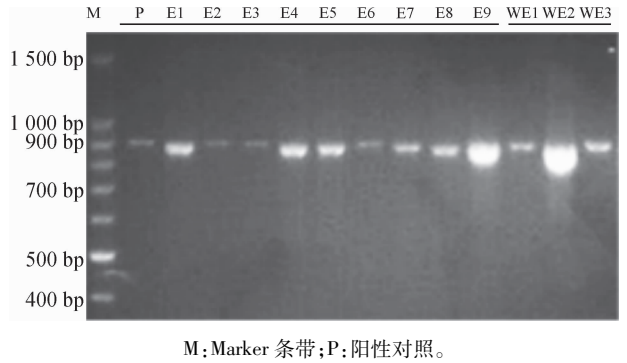


图 2 普通荞麦特异引物 PCR 扩增结果

Fig. 2 Amplification products of common buckwheat DNA using specified primers

列进行分析, 结果发现该片段序列的相对碱基组成频率差别不大, A 为 28.81%、T(U) 为 32.73%、C 为 18.30%, G 为 20.15%, A + T 含量 (61.54%) 明显高于 C + G (38.46%)。使用 ClustalW 对该片段序列进行多重比较分析, 去掉序列两端缺失导致排列不整齐的位点, 对其中 793 个位点进行多态性统计, 结果发现在 12 个供试材料中该基因序列片段的不变位点为 723 个, 多态位点为 70 个 (包含简约信息位点数 43 个)。其中, 在 9 个栽培品种间多态位点仅为 22 个 (包含简约信息位点数 10 个), 3 个野生材料间多态位点为 25 个。

使用 ClustalW 对 12 个供试材料 *MAPK* 基因片段序列进行比较, 结果发现普通荞麦 9 个栽培品种 ORF 区域序列无位点差异, 高度保守; 3 个野生材料中 ORF 区域序列也无位点差异, 高度保守; 但栽培品种与野生材料 ORF 区域序列含有 8 个差异位点。对 ORF 编码的氨基酸序列进行分析发现, 普通荞麦栽培品种与野生材料 ORF 结构域氨基酸序列存在 3 个变异位点 (表 2)。

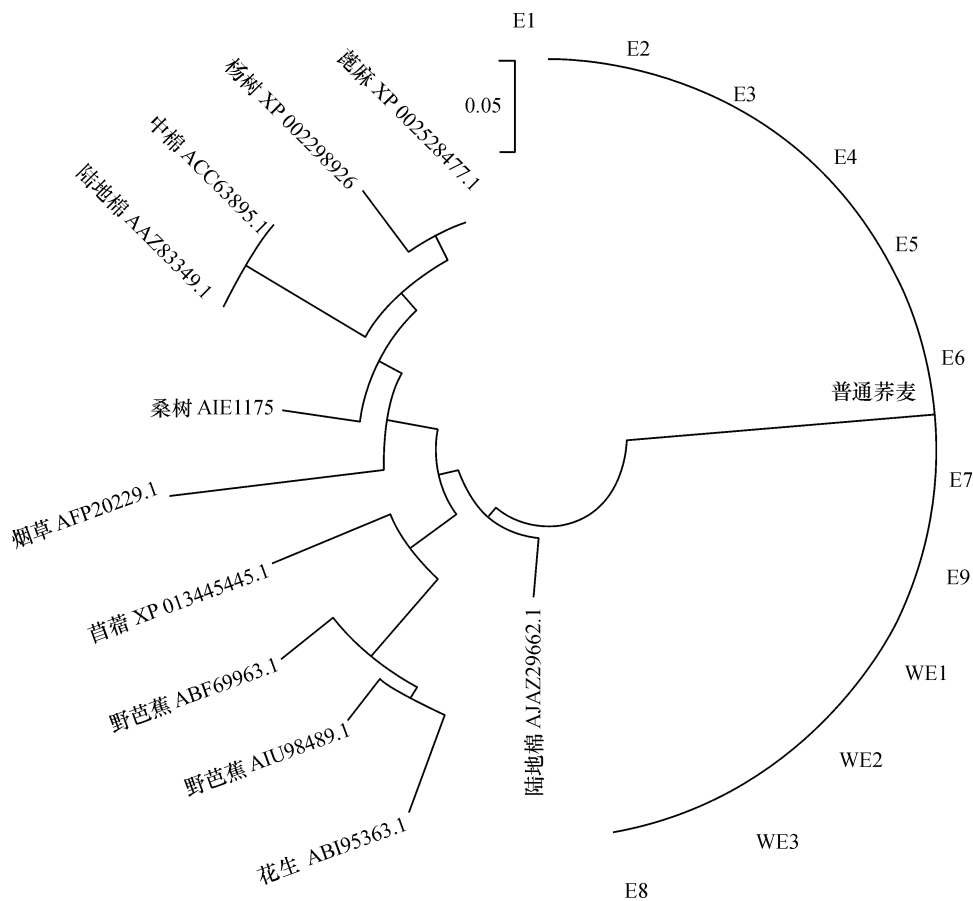


图 4 不同植物 MARK 蛋白序列的聚类分析

Fig. 4 Phylogenetic tree of MAPK protein sequences from different plant species

表 2 普通荞麦栽培品种与野生种质间 MARK ORF 片段的碱基和氨基酸差异位点

Tab. 2 The differential sites of the nucleotides and amino acids in MARK ORF fragments between cultivars and wild types of common buckwheat

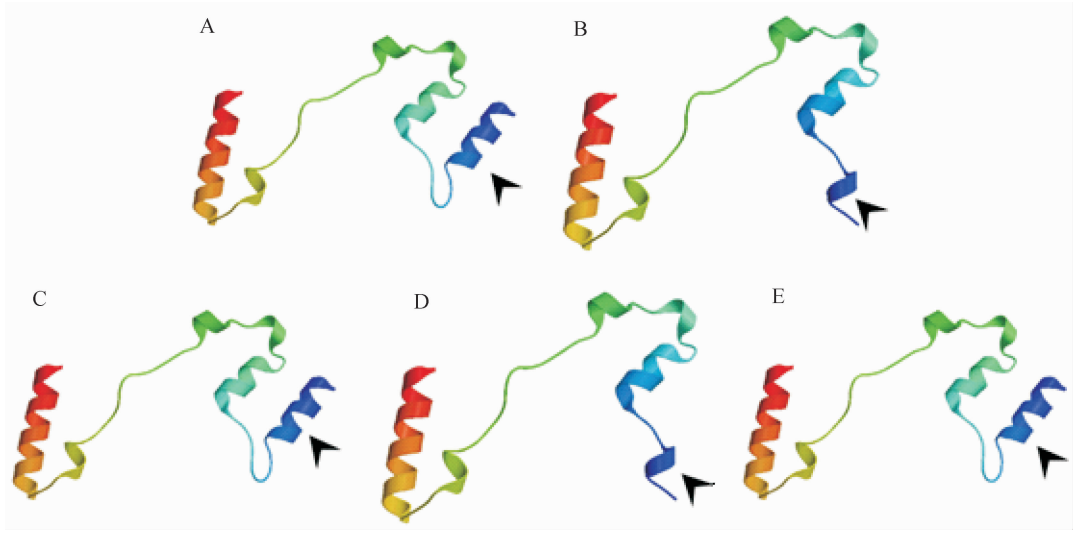
样品编号	碱基位点								氨基酸位点		
	8	37	67	129	189	204	210	249	3	13	23
E1	G	T	A	A	T	G	G	C	Y	H	M
E2	G	T	A	A	T	G	G	C	Y	H	M
E3	G	T	A	A	T	G	G	C	Y	H	M
E4	G	T	A	A	T	G	G	C	Y	H	M
E5	G	T	A	A	T	G	G	C	Y	H	M
E6	G	T	A	A	T	G	G	C	Y	H	M
E7	G	T	A	A	T	G	G	C	Y	H	M
E8	G	T	A	A	T	G	G	C	Y	H	M
E9	G	T	A	A	T	G	G	C	Y	H	M
WE1	A	C	T	G	G	A	C	T	C	Y	L
WE2	A	C	T	G	G	A	C	T	C	Y	L
WE3	A	C	T	G	G	A	C	T	C	Y	L

2.5 普通荞麦丝裂原活化蛋白激酶结构预测

使用 Swiss-model 对 MAPK 的 ORF 片段进行蛋白质结构在线预测,结果发现普通荞麦栽培品种和野生种质材料间 ORF 蛋白结构存在明显的构象差异。从图 5 中可知,与栽培品种相比,3 个氨基酸差

异位点导致野生种质材料 ORF 蛋白的 1 个 α -螺旋构象发生改变。进一步对 3 个氨基酸位点单位点置换后进行蛋白质结构预测,结果发现 ORF 第 13 位点组氨酸(H)→酪氨酸(Y)发生转换导致蛋白结构域发生构象变化(图 5D),而其余 2 个氨基酸位点的转

换并不影响蛋白的构象(图 5C、5E)。



A:栽培品种; B: 野生种质; C、D、E 分别为栽培品种 MAPK 蛋白第 3 位点 Y→C(C)、第 13 位点 H→Y(D)和第 23 位点 M→L(E)发生转换后的结构域;箭头指向结构发生改变的区域。

图 5 普通荞麦 MARK 蛋白结构域分析
Fig. 5 Domain analysis of MAPK protein of common buckwheat

3 讨论与结论

荞麦起源于我国西南地区,种植历史悠久。荞麦生育期短、生长适应性强、抗逆性较强,在历史上一直作为一种重要的救灾粮食作物^[5]。植物 MAPK 基因是 MAPK 级联信号途径中的关键信号分子,在逆境胁迫应答方面具有重要调控作用^[10-11]。生物信息学分析发现荞麦 MAPK 序列全长为 2 835 bp,包含 1 个 1 827 bp 的 ORF,编码 609 个氨基酸。植物 MAPK 具有典型的 TEY 区或 TDY 区的模块,其中,TEY 类分为 A、B、C 3 组,TDY 类则单独为 D 组^[11]。荞麦 MAPK 序列中含有 2 个 TDY 模块,属于 D 组 MAPK 蛋白。

通过 PCR 扩增和目标片段测序得到的目标基因片段的部分序列与 MAPK 基因部分序列相似性达到 100%,因此认为 PCR 扩增得到的产物即为普通荞麦 MAPK 基因片段。特定基因序列间的差异可作为研究物种进化关系的依据^[23]。在线 Blast 比对发现,普通荞麦 MAPK 片段序列与近缘植物,例如陆地棉的 MAPK1 基因(KM190106.1)序列相似性高于 80%,其 ORF 区域编码 1 个 MAPK 蛋白保守结构域,与陆地棉(AJA29662.1;AAZ83349.1)MAPK 蛋白等序列相似性均高于 80%,说明植物 MAPK 基因序列在进化过程中较为保守。李凤梅^[25]研究发现植物丝裂原活化蛋白激酶激酶(MAPKK)基因序列高度保守。本研究发现 12 个供试材料间 MAPK 基因片段序列 793 个位点中多态位点为 70 个,ORF 区域序列多态位点仅为 8 个。尤其是 9 个栽培甜荞间 MAPK 基因片段

ORF 区域序列无差异位点,3 个野生甜荞间 MAPK 基因片段 ORF 区域序列无位点差异,说明栽培驯化过程中普通荞麦 MAPK 基因序列高度保守。

Cho 等^[18]研究发现,MAPK 基因参与调控了植物花器官的花梗离层细胞程序化死亡的过程,进而介导花器官的脱落。Meng 等^[26]研究指出,拟南芥中 MAPK 级联信号下游 ERECTA 受体蛋白激酶通过促进细胞增殖进而调控花梗形态建成。野生甜荞是栽培甜荞的祖先,易落花落果^[1]。克服落花落果习性一直是普通荞麦栽培驯化的一个主要目标。对普通荞麦 MAPK 基因片段 ORF 区域序列分析发现,栽培甜荞与野生甜荞间存在 8 个碱基差异位点,编码 3 个差异氨基酸,导致 1 个 α-螺旋构象发生改变。此外,研究还发现 9 个栽培甜荞间 ORF 区域序列高度一致,3 个野生甜荞间 ORF 区域序列也保持高度一致。说明人工栽培驯化对这 3 个差异氨基酸位点的选择具有高度一致性。与 9 个栽培甜荞相比,供试的 3 个野生甜荞均具有落花落果习性。对 3 个差异氨基酸位点进行单位点置换的蛋白结构预测,结果发现 α-螺旋构象变化是由 ORF 区域第 13 位点组氨酸(H)→酪氨酸(Y)发生置换所导致,暗示其可能与野生甜荞落花进化为不落花型栽培甜荞事件有关。研究结果为进一步研究荞麦 MAPK 基因功能以及栽培进化提供了理论基础。

致谢:感谢贵州师范大学黎瑞源老师给予的支持和帮助!

参考文献:

- [1] 陈庆富. 荞麦属植物科学[M]. 北京: 科学出版社, 2012: 1-9.
- [2] AHMED A, KHALID N, AHMED A, et al. Phytochemicals and biofunctional properties of buckwheat: A review[J]. J Agri Sci, 2014, 152(3): 349-369.
- [3] WIJNGARD H H, ARENDT E K. Buckwheat[J]. Cereal Chem, 2006, 83(4): 391-401.
- [4] SEDEJ I, SAKAČ M, MANDIĆ A, et al. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain and fractions: Antioxidant compounds and activities[J]. J Food Sci, 2012, 77(9): 954-959.
- [5] JACQUEMART A L, LEDENT J F O, QUINET M, et al. Is buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) still a valuable crop today? [J]. Eur J Plant Sci Biotech, 2012, 6 (Special Issue 2): 1-10.
- [6] OHNISHI O. Discovery of the wild ancestor of common buckwheat[J]. Fagopyrum, 1991, 11:5-10.
- [7] OHNISHI O, ASANO N. Genetic diversity of *Fagopyrum homotropicum*, a wild species related to common buckwheat[J]. Gen Res Crop Evol, 1999, 46(4): 389-398.
- [8] 朱斌, 梁颖. 植物 MAPK C 族基因的研究进展[J]. 生物技术通报, 2012 (11): 27-31.
- [9] 崔菁菁, 刘玮. 植物特有的 TDY 类丝裂原活化蛋白激酶研究综述[J]. 现代农业科技, 2008(14): 271-272.
- [10] BOUDSOCQ M, DANQUAH A, DE ZÉLICOURT A, et al. Plant MAPK cascades: Just rapid signaling modules? [J]. Plant Signal Behav, 2015, 10(9): e1062197.
- [11] 张腾国, 刘玉冰, 夏小慧. 植物 MAP 激酶级联途径研究进展[J]. 西北植物学报, 2008, 28(8): 1704-1714.
- [12] 龚小卫, 姜勇. 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)生物学功能的结构基础[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(1): 5-11.
- [13] 张茂迎, 宗晓娟, 李德全. 植物 MAPK 级联途径参与调控 ABA 信号转导[J]. 生命科学, 2010, 22(8): 736-743.
- [14] NAKAGAMI H, PITZSCHKE A, HIRT H. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling [J]. Trends Plant Sci, 2005, 10(7): 339-346.
- [15] DANQUAH A, DE ZÉLICOURT A, COLCOMBET J, et al. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses[J]. Biotech Adv, 2014, 32 (1): 40-52.
- [16] 高华健, 任静, 蔡凤香, 等. MAPK 调节水稻幼苗根系生长的分子机制[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 18-21.
- [17] 梁卫红, 毕佳佳, 彭威风, 等. 水稻促分裂原活化蛋白激酶基因 *OsMPK14* 的克隆及表达分析[J]. 中国水稻科学, 2010, 24(2): 125-130.
- [18] CHO S K, LARUE C T, CHEVALIER D, et al. Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(40): 15629-15634.
- [19] 陈晴晴, 石桃雄, 陈庆富. 荞麦不同种间 BW10KD 过敏蛋白基因序列比较[J]. 广东农业科学, 2013, 40 (9): 133-139.
- [20] ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J, et al. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling [J]. Bioinformatics, 2006, 22: 195-201.
- [21] SCHWEDE T, KOPP J, GUEX N, et al. Swiss-model: An automated protein homology-modeling server[J]. Nucl Acids Res, 2003, 31(13): 3381-3385.
- [22] GUEX N, PEITSCH M C. Swiss-model and the swiss-pdb viewer: An environment for comparative protein modeling [J]. Electrophoresis, 1997, 18: 2714-2723.
- [23] 岳鹏, 陈庆富. 植物种子蛋白的分子生物学研究进展[J]. 种子, 2011, 30(1): 58-62.
- [24] 肖文娟, 宾金华, 武波. 植物体中的 MAPK[J]. 植物学通报, 2004, 21(2): 205-215.
- [25] 李凤梅. 植物丝裂原活化蛋白激酶激酶的生物信息学分析[J]. 北方园艺, 2010(3): 196-199.
- [26] MENG X, WANG H, HE Y, et al. A MAPK cascade downstream of ERECTA receptor-like protein kinase regulates *Arabidopsis* inflorescence architecture by promoting localized cell proliferation [J]. Plant Cell, 2012, 24 (12): 4948-4960.

【责任编辑 庄 延, 周志红】