

# 小麦成熟胚脱分化过程中 MAPKs 相关基因的表达分析

\*

李明杰,马平安,张艳敏,崔党群,陈新建,陈军营

(河南农业大学农学院,河南郑州 450002)

**摘要:** 为了研究小麦成熟胚脱分化过程中 MAPKs 相关基因序列的表达变化情况,利用 Affymetrix 小麦基因芯片研究了小麦成熟胚在 MS+2,4-D ( $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 培养基上脱分化过程不同时间点的基因表达变化,用 NCBI、DATF 和 DRTF 等生物信息学相关网站对基因表达信息进行处理,通过 PLEXdb 的 Blast 比对方方法在小麦基因组芯片中找到与拟南芥、水稻等作物同源性较高的 MAPK 序列,研究其在脱分化中表达变化情况。结果表明,有 1 个 MAPKKKKs(简称 MAP4K)、17 个 MAPKKKs(简称 MAP3K)、5 个 MAPKKs(简称 MAP2K)、9 个 MAPK 相关基因、7 个 MAPK 级联负调控因子基因和 4 个细胞周期蛋白基因在小麦成熟胚脱分化过程中的 2、6、12、24、72 h 等不同时间点至少发生了一次有意义的表达变化,其中上调表达基因 20 个,下调表达基因 21 个,先下调后上调表达基因 2 个。根据已知 MAPK 的生物功能和它们在小麦成熟胚脱分化过程中的表达变化趋势及其与脱分化过程中的吻合程度,推测 TaMAPK1C、TaMAPK2A、TaMAPK2B、OsMAPK4、AtMKK6、AtPTP1 等基因参与了小麦成熟胚脱分化过程中的激素响应、胁迫响应及细胞周期调控,表明这些基因在小麦成熟胚脱分化的启动和进行过程中具有重要作用。

**关键词:** 小麦;成熟胚;MAPKs;基因芯片;脱分化

**中图分类号:** S512.1;S330

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1009-1041(2011)01-0001-08

## Analysis of MAPKs-related Genes Expression during Mature Embryo Dedifferentiation in Wheat

LI Ming-jie, MA Ping-an, ZHANG Yan-min, CUI Dang-qun, CHEN Xin-jian, CHEN Jun-ying

(College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

**Abstract:** To elucidate the mechanism of mature wheat embryo dedifferentiation, the expression profile of genes during dedifferentiation was studied by Affymetrix microarray technique in mature embryos of wheat cultivar Yumai 18 cultured on MS medium supplemented with  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  of 2,4-dichlorophenolxyacetic acid (2,4-D) at different time points of 2, 6, 12, 24 and 72 h. The expression information was processed using online tools at NCBI, DATF, and DRTF websites, the similar sequence with MAPK gene were searched in Arabidopsis and Rice Database System by PLEXdb Blast, and their expression profile during the dedifferentiation were analyzed. The results showed that there were one MAPKKKKs, 17 MAPKKKs, 5 MAPKKs, 9 MAPK related genes, 7 MAPK cascade negative regulation factor genes, and 4 cell cyclin genes changed at least at one time point, which included 20 up-regulated, 21 down-regulated and 2 down-regulated at first and then up-regulated during the whole period. According to the known functions of MAPK, their changing trend, and the consistency between the trend and dedifferentiation proceeding, it was predicted that TaMAPK1C, TaMAPK2A, TaMAPK2B, OsMAPK4, AtMKK6, AtPTP1 might participate in the processes of hormone response, stress response, and cell cycle regulation etc. These suggested that these genes would play an impor-

\* 收稿日期:2010-06-25 修回日期:2010-08-20

**基金项目:** 国家科技部转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08002-004)。

**作者简介:** 李明杰(1984—),男,硕士研究生,主要从事作物育种与种子生物学研究。E-mail: xinyuzszj@163.com

**通讯作者:** 陈军营(1964—),男,副教授,博士,主要从事作物育种与种子生物学研究。E-mail: chenjunying3978@126.com

tant role in triggering and promotion dedifferentiation of mature embryo in wheat.

**Key words:** Wheat ; Mature embryo; MAPKs; Microarray; Dedifferentiation

小麦是最重要的禾谷类作物之一,因其遗传背景复杂、外植体组培再生能力较差,严重影响了生物技术在其遗传改良中的应用。目前公认的最好的基因转化受体是小麦幼胚,但幼胚获得受到季节、发育状态等因素的影响,从而限制了其在小麦遗传转化中的应用。小麦成熟胚具有发育状态一致、取材方便、操作简单、不受季节限制等优点,但转化效率较低,其根本原因在于小麦成熟胚细胞脱分化质量差。细胞脱分化是指已分化细胞失去原有结构和功能,形成愈伤组织的过程。在激素作用下诱导特定基因的表达是脱分化启动的关键,其间存在许多信号转导及生理生化过程<sup>[1,2]</sup>。丝裂原激活蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是一类 Ser/Thr 蛋白激酶,存在于所有真核细胞中,在发育信号、分裂信息、胁迫因子等不同信号的刺激下,Ser/Thr 部位被迅速磷酸化而激活。该酶一般分为 MAP3K(MAP-KKK)、MAP2K(MAPKK)、MAPK 三类,它们一起组成依次磷酸化的 MAPK 链,将外界信号传递至细胞核,启动相应基因的表达。已有研究表明,MAPK 在植物组织脱分化启动过程中起着重要作用<sup>[3-7]</sup>,一些植物中已经发现大量 MAPK 的存在<sup>[8-10]</sup>,但目前小麦中 MAPK 被发现鉴定数量较少(UniProtKB 登记的只有 12 种),小麦成熟胚脱分化过程中 MAPK 相关基因的研究尚未见报道。本研究以小麦成熟胚为材料,用 2,4-D 诱导其脱分化,采用 Affymetrix 小麦基因组芯片技术研究脱分化表达谱,通过与拟南芥、水稻等作物中编码 MAPK 基因的比对分析,找到 MAPKs 相关基因类似序列,研究其在脱分化过程中的表达变化,以期揭示小麦成熟胚脱分化的可能机制提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

在超净工作台上剥取普通小麦品种豫麦 18 种子的成熟胚,置于 MS+2,4-D( $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )培养基上培养<sup>[11]</sup>,根据河南农业大学农学院分子生物学实验室对小麦成熟胚脱分化过程中外部形态和内部结构的前期研究结果(另文发表),确定取样时间点为 0、2、6、12、24 和 72 h。取样后经液氮

处理并于  $-80^\circ\text{C}$  保存备用。

### 1.2 总 RNA 提取与纯化

按 Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司,美国)使用说明提取总 RNA,并用 RNeasy mini 试剂盒(QIAGEN 公司,荷兰)纯化。用 1% 琼脂糖凝胶电泳( $180 \text{ V}, 0.5 \text{ h}$ )检测总 RNA 的 28 S 和 18 S 比例,其亮度约为 2:1;在 260/280 nm 波长下测定总 RNA 的吸光值,计算其浓度和纯度<sup>[12]</sup>。

### 1.3 基因芯片数据的获得

#### 1.3.1 cDNA 和 cRNA 合成

合成 cDNA 时,模板量为总 RNA  $1\sim 8 \mu\text{g}$ 。合成生物素标记的 cRNA 时,取  $12 \mu\text{L}$  上述 cDNA 溶液作模板。cDNA 和 cRNA 纯化按基因芯片分析样品纯化操作程序进行<sup>[13]</sup>。两者的浓度、纯度和质量检测方法同上<sup>[12]</sup>。

#### 1.3.2 cRNA 片段化和芯片检测

取  $15 \mu\text{L}$  cRNA( $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ),加  $6 \mu\text{L}$   $5\times$  片段化缓冲液和  $9 \mu\text{L}$  无 RNA 酶水混匀, $94^\circ\text{C}$  温浴 35 min,得到长度为 35~200 bp 的 cRNA 片段。按 Affymetrix 公司提供的配方配制杂交液,然后将杂交液加至经预杂交处理的 Affymetrix wheat Gene Chip(美国 Affymetrix 公司,64 K)内,于  $45^\circ\text{C}$ 、 $60 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下在基因芯片杂交炉 640 中杂交,每一个杂交芯片均与每个样品  $10 \mu\text{g}$  的 cRNA 杂交 16 h,杂交完成后吸去杂交液,用 Gene Chip 全自动洗涤工作站 450(Affymetrix 公司,美国)洗涤和染色芯片。用高分辨芯片扫描仪 3000(Affymetrix 公司,美国)扫描芯片,用 GCOS1.2 软件读取、处理信号值数据,获得归一化后的信号值、信号检出(P, A, M)以及实验和对照组的比值<sup>[14]</sup>。

#### 1.3.3 小麦基因组芯片中 MAPKs 相关基因的确认

利用 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、DATF(<http://datf.cbi.pku.edu.cn>)和 DRTF(<http://drtf.cbi.pku.edu.cn>)网站的相关资料对小麦基因芯片检测结果进行初步注释和分析。利用 PLEXdb(<http://plexdb.org>)数据库中的在线 Blast 工具,对 UniProt、TIGR、DFCI、NCBI Unigene 等数据库进行 BlastN、BlastX 检索,按系统默认参数找出推定的 MAPKs 相关基因。

获取每个基因在 0、2、6、12、24、72 h 等时间点的表达信号值,同时以每个时间点的表达信号值除以 0 h(对照)的表达信号值,将所得商取以 2 为底的对数,其结果是正值为上调表达( $\geq +1$  为有显著上调差异表达),负值为下调表达(数值 $\leq -1$  为有显著下调差异表达)。

#### 1.4 半定量 RT-PCR 验证

为验证基因芯片数据的可靠性,将 1.2 中提

取的 RNA 反转录成 cDNA,根据基因芯片数据对 CA687955 等 8 个基因(表 1)进行半定量 RT-PCR 验证,以  $\beta$ -actin 为内参,PCR 条件为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环,72 °C 延伸 5 min,4 °C 保存。其他 7 个待测基因的 PCR 条件除退火温度与内参的不同外(表 1),均保持一致。

表 1 用于半定量 RT-PCR 分析的 8 个基因及其引物序列、退火温度和扩增产物

Table 1 Eight genes analyzed by semi RT-PCR and their primer sequence, annealing temperature, and product size

Genbank 登录号 Genbank ID	引物 Primer (5'→3')		退火温度 Annealing temperature/°C	扩增产物 Product size /bp
	正向引物 Forward	反向引物 Reversed		
CA687955	TCCCAGTGTTACATTGAGT	GTTGGAGATGGTTTAGCG	55	108
CD908901	ACCATGATAGGGAATAG	ATGCCAACAAGCAGACAC	52	111
BJ259419	TATCACTCGGGTGCCTAA	ATACCTCGTGCCACATCA	51	138
BJ212569	TGCCATTGGATCAGGAAG	TGCGGAACACCATCAGTC	55	284
CD452625	TGTTTCATCTTATCCACCTA	GGCTTGTAATCCCTTCAC	50	278
BJ307455	GCCCTTACCAAGTATTA	TTCTGTTCAATGGCTCTG	52	279
BJ219634	GCCAACTACCAGCAACAC	AGCATCCCTATTTCAACA	50	186
CA662794	CCAATAAGCGAGCATAAA	CTAAGAGCCAAGACCAAA	51	114
$\beta$ -actin	GTTCCAATCTATGAGGGATA-CACGC	GAACCTCCACTGAGAACAA-CATTACC	55	421

## 2 结果与分析

### 2.1 MAPK 级联途径相关基因的获得及在成熟胚脱分化过程中的整体表达

通过与拟南芥、水稻等作物中编码 MAP4Ks、MAP3Ks、MAP2Ks、MAPKs 的基因和 MAPK 级联调控相关基因的比对分析,在 Affymetrix 小麦基因组芯片中找到 43 个同源序列在小麦成熟胚脱分化过程发生有意义的表达变化,其中 MAP4Ks 相关基因 1 个(上调);MAP3Ks 相关基因 17 个(上调的 6 个,下调 11 个);MAP2Ks 相关基因 5 个(上调 1 个,下调 3 个,先下调后上调的 1 个);MAPKs 相关基因 9 个(上调 6 个,下调 3 个);MAPK 级联负调控相关基因 7 个(上调 3 个,下调 4 个);细胞分裂调控相关基因 4 个(上调 3 个,先下调后上调 1 个)(具体见表 2)。

### 2.2 MAP4K、MAP3K 相关基因的表达

基因芯片检测结果发现,1 个编码推定的 Os-MAP4K 基因(CF133524)在小麦成熟胚脱分化过程的 2~24 h 表现上调,72 h 上调幅度有所下

降;4 个编码类似水稻的 OsMAP3K $\delta$ 1 基因(如 BJ259419、CA642143、CD373891 等)分别在 2~72 h、6~72 h、12~72 h 上调;1 个编码推定的 OsMAP3K $\gamma$ 1 基因(BJ216852)在 72 h 上调;1 个编码增强抗病蛋白(EDR1 蛋白)基因(CD452625)在 2 和 12~24 h 上调,6 h 上调幅度下降。检测到 2 个编码类似水稻的 MAP3K $\delta$ 1 基因(CD932774、CD453834),2 个编码类似水稻的 MAP3K $\alpha$  基因(CA500328、CA678668),3 个编码推定的 AtMEKK1 基因(BJ269854、CD905906、CA497595)在 2~72 h 不同程度下调;1 个编码类似烟草 NPK1 相关蛋白的基因(AL829285)在 6~72 h 下调;2 个编码推定的 ATN1-like 蛋白基因(BJ309658、CD452516)在 12~24 h 下调;1 个编码推定的 MAP3K 基因(CA642399)在 12 h 下调,其它时间点下调幅度不明显。

### 2.3 MAP2K 相关基因的表达

基因芯片检测结果发现 1 个编码推定的 At-MKK6 基因(CA665233),在小麦成熟胚脱分化过程的 2~6 h、24~72 h 上调,12 h 变化不显著;2 个编码类似拟南芥 AtMKK3 的基因

(BJ307455、CA656400)在2~24 h不同程度下调;2个编码推定的MAPKK基因中BE444161在12 h下调,CA635014在2 h和12 h分别下调和上调,其它时间点变化不显著。

表2 小麦成熟胚脱分化过程中MAPK级联途径中相关基因的表达

Table 2 Expression pattern of MAPK casades-related genes in dedifferentiation of mature embryos in wheat

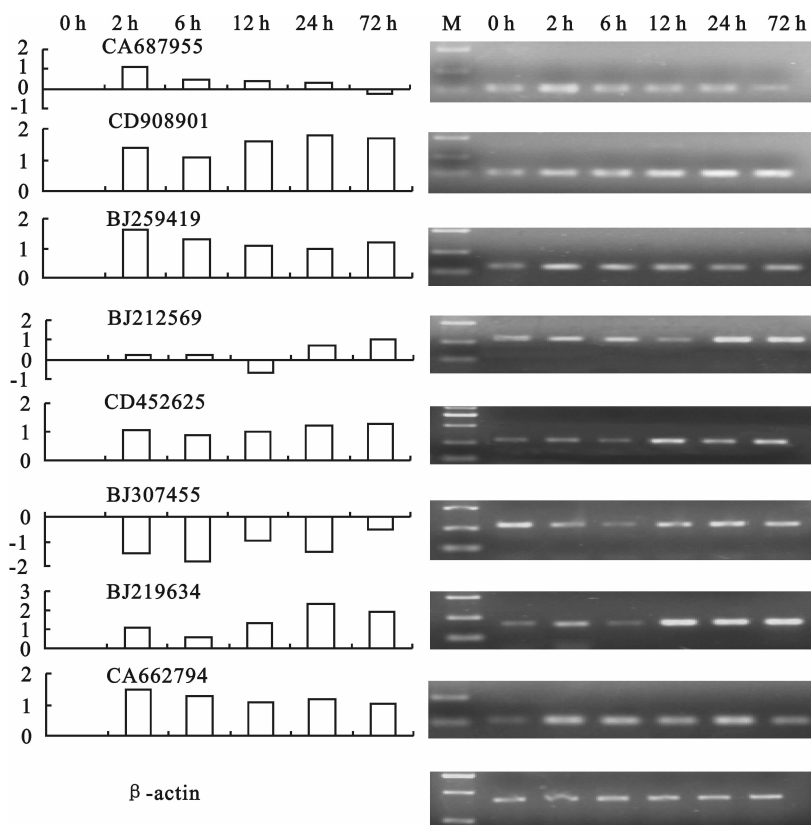
Genbank 登录号 Genbank ID	0 h	2 h	6 h	12 h	24 h	72 h	基因功能描述 Gene function description
编码 MAPKKK(MAP4K)的相关基因 MAP4K protein related genes							
CF133524	0	<b>1.4</b>	<b>1.4</b>	<b>1.3</b>	<b>1.2</b>	0.8	推定的水稻丝裂原激活蛋白激酶激酶激酶(OsMAP4K)
编码 MAPKK(MAP3K)的相关基因 MAP3K protein related genes							
BJ259419	0	<b>1.6</b>	<b>1.3</b>	<b>1.1</b>	<b>1</b>	<b>1.2</b>	推定的水稻丝裂原激活蛋白激酶激酶激酶 $\delta$ 1(OsMAP3K $\delta$ 1)
CA642143	0	0.94	<b>1.1</b>	<b>1.06</b>	<b>1.1</b>	<b>1.5</b>	推定的水稻丝裂原激活蛋白激酶激酶激酶 $\delta$ 1(OsMAP3K $\delta$ 1)
CA697195	0	<b>1.09</b>	0.8	0.7	0.8	<b>1</b>	推定的水稻丝裂原激活蛋白激酶激酶激酶 $\delta$ 1(OsMAP3K $\delta$ 1)
CD373891	0	0.5	0.7	<b>1</b>	<b>1.4</b>	<b>1.3</b>	推定的水稻丝裂原激活蛋白激酶激酶激酶 $\delta$ 1(OsMAP3K $\delta$ 1)
BJ216852	0	0.5	0.6	0.4	0.3	<b>1.5</b>	推定的水稻丝裂原激活蛋白激酶激酶激酶 $\gamma$ 1(OsMAP3K $\gamma$ 1)
CD452625	0	<b>1.07</b>	0.89	<b>1.02</b>	<b>1.2</b>	<b>1.3</b>	增强抗病蛋白(EDR1)
CD932774	0	<u>-1.3</u>	<u>-1.1</u>	<u>-1</u>	<u>-1.3</u>	<u>-1.5</u>	推定的水稻丝裂原激活蛋白激酶激酶激酶 $\delta$ 1(OsMAP3K $\delta$ 1)
CD453834	0	<u>-0.4</u>	<u>-0.6</u>	<u>-2.06</u>	<u>-1.02</u>	<u>-0.5</u>	推定的水稻丝裂原激活蛋白激酶激酶激酶 $\delta$ 1(OsMAP3K $\delta$ 1)
CA500328	0	<u>-2.4</u>	<u>-4</u>	<u>-3.4</u>	<u>-2.7</u>	<u>-1.9</u>	推定的水稻丝裂原激活蛋白激酶激酶激酶 $\alpha$ (OsMAP3K $\alpha$ )
CA678668	0	<u>-0.1</u>	<u>-0.7</u>	<u>-0.96</u>	<u>-1.2</u>	<u>-0.3</u>	推定的水稻丝裂原激活蛋白激酶激酶激酶 $\alpha$ (OsMAP3K $\alpha$ )
BJ269854	0	<u>-0.4</u>	<u>-1.02</u>	<u>-1.5</u>	<u>-1.3</u>	<u>-0.6</u>	推定的拟南芥丝裂原激活蛋白激酶激酶激酶1(AtMEKK1)
CA497595	0	<u>-1.3</u>	<u>-1.6</u>	<u>-1.6</u>	<u>-0.92</u>	<u>-0.97</u>	推定的拟南芥丝裂原激活蛋白激酶激酶激酶1(AtMEKK1)
CD905906	0	<u>-0.6</u>	<u>-0.7</u>	<u>-1.04</u>	<u>-0.8</u>	<u>-0.17</u>	推定的拟南芥丝裂原激活蛋白激酶激酶激酶1(AtMEKK1)
AL829285	0	0.01	<u>-1.1</u>	<u>-2.4</u>	<u>-2.9</u>	<u>-1.6</u>	烟草蛋白激酶1相关蛋白NPK1
BJ309658	0	<u>-0.9</u>	<u>-0.7</u>	<u>-1.3</u>	<u>-1.2</u>	0.5	推定的ATN1类似蛋白
CD452516	0	<u>-0.3</u>	<u>-0.97</u>	<u>-1.5</u>	<u>-1.3</u>	0.2	推定的ATN1类似蛋白
CA642399	0	<u>-0.4</u>	<u>-0.6</u>	<u>-1.1</u>	<u>-0.1</u>	<u>-0.3</u>	推定的丝裂原激活蛋白激酶激酶激酶(MAP3K)
编码 MAPKK(MAP2K)的相关基因 MAP2K protein related genes							
CA665233	0	<b>1.2</b>	<b>1.2</b>	-0.03	<b>1.7</b>	<b>1.4</b>	推定的拟南芥丝裂原激活蛋白激酶激酶6(AtMKK6)
BJ307455	0	<u>-1.5</u>	<u>-1.8</u>	<u>-0.96</u>	<u>-1.4</u>	<u>-0.5</u>	推定的拟南芥丝裂原激活蛋白激酶激酶3(AtMKK3)
CA656400	0	<u>-1.2</u>	<u>-2</u>	<u>-1.1</u>	<u>-1.2</u>	<u>-0.3</u>	推定的拟南芥丝裂原激活蛋白激酶激酶3(AtMKK3)
BE444161	0	<u>-0.5</u>	<u>-0.6</u>	<u>-1.7</u>	<u>-0.2</u>	0.01	推定的水稻丝裂原激活蛋白激酶激酶(OsMAPKK)
CA635014	0	<u>-2.3</u>	0.6	<b>1.3</b>	0.2	0.4	推定的水稻丝裂原激活蛋白激酶激酶(OsMAPKK)
编码 MAPK 的相关基因 MAPK protein related genes							
CA662794	0	<b>1.5</b>	<b>1.3</b>	<b>1.07</b>	<b>1.2</b>	<b>1.01</b>	推定的水稻丝裂原激活蛋白激酶4(OsMAPK4)
CA679714	0	<b>1.5</b>	<b>1.1</b>	0.7	0.86	<b>1.04</b>	推定的水稻丝裂原激活蛋白激酶4(OsMAPK4)
CA687955	0	<b>1.1</b>	0.5	0.4	0.3	-0.3	小麦丝裂原激活蛋白激酶1C(TaMAPK1C)
BJ229772	0	0.7	0.3	0.5	0.5	<b>1.33</b>	小麦丝裂原激活蛋白激酶2A(TaMAPK2A)
BJ212569	0	0.22	0.23	-0.65	0.7	<b>1.01</b>	小麦丝裂原激活蛋白激酶2B(TaMAPK2B)
BJ276567	0	0.2	-0.3	-0.2	0.1	<b>1</b>	推定的拟南芥丝裂原激活蛋白激酶18(AtMPK18)
BE216979	0	<u>-2.3</u>	<u>-1.7</u>	<u>-1.7</u>	<u>-3.1</u>	<u>-3.1</u>	推定的水稻丝裂原激活蛋白激酶2(OsMAPK2)
CA708621	0	0	-0.2	<u>-1</u>	0	0.7	推定的水稻丝裂原激活蛋白激酶2(OsMAPK2)
CD897973	0	<u>-0.5</u>	<u>-0.9</u>	<u>-2.2</u>	<u>-1.6</u>	<u>-2.06</u>	推定的拟南芥丝裂原激活蛋白激酶20(AtMPK20)
编码 MAPK 级联负调控因子的相关基因 MAPK casades negative factor related genes							
BQ162670	0	<b>1</b>	<b>1.2</b>	0.8	<b>1.1</b>	0.9	推定的拟南芥蛋白酪氨酸磷酸酶1(AtPTP1)
CD926296	0	<b>1.3</b>	0.9	0.1	<b>1.2</b>	<b>1.4</b>	推定的拟南芥蛋白酪氨酸磷酸酶1(AtPTP1)
BQ166188	0	<b>1.2</b>	<b>1.3</b>	<b>1.5</b>	<b>1.1</b>	0.7	推定的蛋白磷酸酶2C(PP2C)
CA606233	0	<u>-1.04</u>	<u>-1.6</u>	<u>-1.9</u>	<u>-1.4</u>	<u>-0.74</u>	推定的蛋白磷酸酶2C(PP2C)
CK197380	0	<u>-1.4</u>	<u>-1.4</u>	<u>-1.5</u>	<u>-0.8</u>	<u>-0.6</u>	推定的蛋白磷酸酶2C(PP2C)
CA646341	0	<u>-1.1</u>	<u>-0.96</u>	<u>-0.8</u>	<u>-0.2</u>	<u>-1.3</u>	推定的蛋白磷酸酶2C(PP2C)

(续表 2)

Genbank 登录号 Genbank ID	0 h	2 h	6 h	12 h	24 h	72 h	基因功能描述 Gene function description
CD923919	0	0.1	<u>-2.0</u>	-0.5	-0.2	0.2	推定的玉米丝裂原激活蛋白激酶磷酸酶 1(zmMKP1)
编码细胞周期蛋白的相关基因 Cyclin protein related genes							
CA675884	0	<b>1.5</b>	<b>1.3</b>	<b>1.6</b>	<b>1.4</b>	<b>1.6</b>	推定的小麦 G1/S 期细胞周期特异蛋白 C 型
CD908901	0	<b>1.4</b>	<b>1.1</b>	<b>1.6</b>	<b>1.8</b>	<b>1.7</b>	推定的细胞周期 C 类似蛋白
BJ219634	0	<b>1.1</b>	0.6	<b>1.3</b>	<b>2.3</b>	<b>1.9</b>	推定的细胞周期蛋白依赖性激酶 B1-1 (CDK B1-1)
CD873495	0	<u>-0.7</u>	<u>-6.5</u>	-1.6	<b>2.9</b>	<b>3.0</b>	推定的细胞周期蛋白

表中数字表示基因芯片上 0、2、6、12、24、72 h 时间点的表达信号值除以 0 h(对照)表达信号值并将所得商取以 2 为底的对数;粗体字代表有意义上调;下画线代表有意义下调。

The values in table 2 is log<sub>2</sub> ratio of the signal values of genes at different time point on genechip to control (0 h). Significant up-regulation is shown in bold number. Significant down-regulation is underlined number.



左图横轴表示小麦成熟胚脱分化过程(0~72 h),纵轴为基因芯片上各时间点与对照(0 h)基因表达信号值比值取以 2 为底的对数;M 为 DL2000 DNA marker

Histogram's horizontal axis represents the dedifferentiation times course(0~72 h), vertical axis shows log<sub>2</sub> ratio of the signal values of genes at different time point on the genechip to control (0 h). M: DL2000 DNA marker

图 1 部分基因的基因芯片结果(左)和半定量 RT-PCR 验证结果(右)

Fig. 1 Gene chip results of some genes (left) and their verifications by semi RT-PCR (right)

## 2.4 MAPK 相关基因的表达

基因芯片检测结果发现,2 个编码类似水稻 OsMAPK4 基因(CA662794、CA679714)在 2~72 h 不同程度上调;1 个编码 TaMAPK1C 基因(CA687955)在 2 h 上调;1 个编码 TaMAPK2A

基因(BJ229722)、1 个编码 TaMAPK2B 基因(BJ212569)、1 个编码类似拟南芥 AtMPK18 基因(BJ276567)在 72 h 上调;2 个编码类似水稻 OsMAPK2 基因(BE216979、CA708621)在 2~72 h 下调;1 个编码类似拟南芥 AtMPK20 基因

(CD897973)在12~72 h下调。

### 2.5 MAPK 级联途径的负调控因子相关基因的表达

基因芯片检测结果发现,2个编码推定的 At-PTP1 基因(BQ162670、CD926296)在2~72 h不同程度上调;4个编码推定的 PP2C 磷酸酶基因中1个(BQ166188)在2~24 h上调,其余3个(CA606233、CA646341、CK197380)不同程度下调;1个编码 ZmMPK1 基因(CD923919)在6 h显著下调。

### 2.6 细胞周期调控相关基因的表达

基因芯片检测结果发现,1个编码推定的细胞周期蛋白依赖性激酶 B1-1(CDKB1-1)基因(BJ219634)、1个编码 G1/S 期细胞周期特异蛋白 C(Cyclin)基因(CA675884)、1个编码细胞周期 C 类似蛋白基因(CD908901)在小麦成熟胚脱分化过程中出现不同程度的上调。检测到1个编码推定的细胞周期蛋白基因(CD873495)在6~

12 h 下调,24~72 h 上调。

### 2.7 半定量 RT-PCR 验证目的基因在脱分化过程中的表达变化

从8个基因的半定量 RT-PCR 结果(图1)可以看出,编码 TaMAPK1C 基因(CA687955)在2 h 表达量较大(与 actin 比,下同),其它时间点依次降低;编码细胞周期 C 类似蛋白基因(CD908901)、类似水稻 OsMAPK4 基因(CA662794)、类似水稻 OsMAP3Kδ1 基因(BJ259419)在2~72 h 表达量明显升高;编码增强抗病蛋白(EDR1 蛋白)基因(CD452625)和推定的细胞周期蛋白依赖性激酶 B1-1(CDKB1-1)基因(BJ219634)在2和12~72 h 表达量较大;编码类似拟南芥 AtMKK3 基因(BJ307455)在2、6 h 表达量下降;编码 TaMAPK2B 基因(BJ212569)在24、72 h 表达量较大。可见,8个基因的半定量 RT-PCR 结果与基因芯片检测结果基本一致,表明基因芯片检测结果准确可靠。

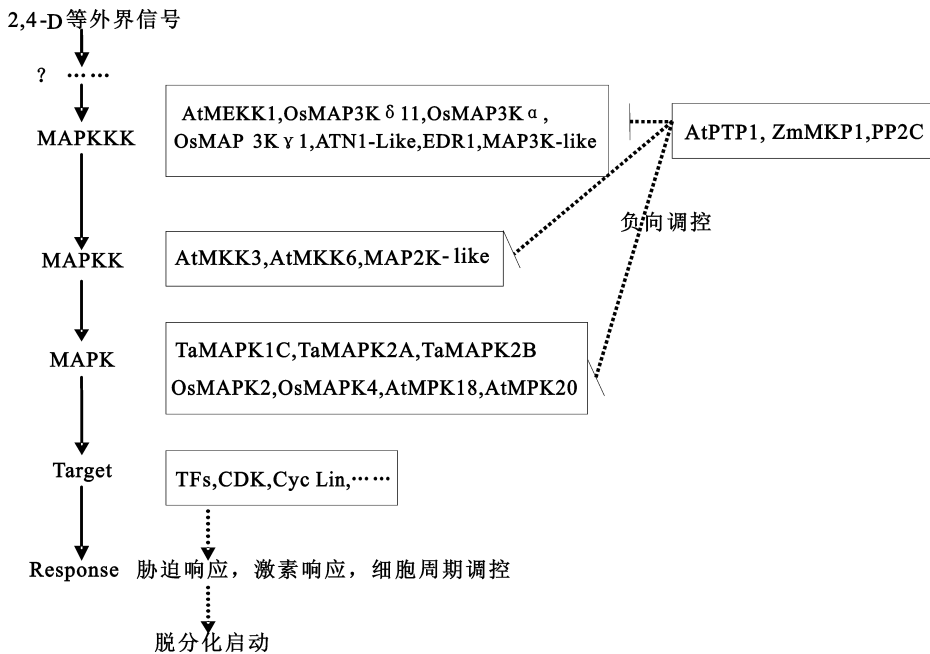


图2 小麦成熟胚脱分化过程中 MAPK 级联相关激酶间可能的作用方式

Fig. 2 Possible pattern of MAPK cascades-related kinases in dedifferentiation of mature embryos in wheat

## 3 讨论

脱分化是细胞接受外界信号后经过复杂调控使细胞重新进入细胞周期,进行有丝分裂形成愈伤组织的过程。MAPK 相关的激酶在细胞的 G1/S、G2/M 期转变过程中起重要的调控作

用<sup>[15,16]</sup>,动物中的 ERKs(MAPK)在细胞分裂和分化中发挥重要作用<sup>[17]</sup>,植物中所有已知的 MAPKs 与动物的 ERKs 结构上非常相似<sup>[18,19]</sup>。本研究结果显示,OsMAPK4、TaMAPK1C、TaMAPK2A、TaMAPK2B 基因在脱分化中显著上调表达,表明它们参与脱分化有丝分裂调控和

其它事件响应。

MAPK 级联三个单元中 MAP2K 成员最少,它位于 MAPK 级联的中间位置且被 MAP3K 激活,不同 MAPK 信号途径在此交汇,在 MAPK 级联中起承上启下的作用<sup>[20]</sup>。已有研究表明,在烟草中的 NtMEK1、拟南芥中的 AtMKK6 参与细胞周期的调控<sup>[21,22]</sup>,AtMKK3 的表达与 ABA、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、JA 等胁迫信号途径相关<sup>[23]</sup>。本研究表明,在 2,4-D 诱导的小麦成熟胚脱分化过程中,编码 AtMKK6 类似基因(CA665233)显著上调表达,与 G1/S 的特异周期蛋白基因呈现相同表达趋势,这暗示此基因产物可能与细胞周期的调控相关。编码 AtMKK3 类似基因(BJ307455、CA656400)呈现显著的下调表达,推测这个基因可能在脱分化胁迫信号传导中起作用。

MAP3K 位于 MAPK 级联的最上游,外界信号将其活化后,激活下游 MAP2K<sup>[8]</sup>。MAP3K 与 MAP2K、MAPK 相比,其蛋白结构上含有更多的调节区域(如 GTP 结合蛋白的结合域、亮氨酸拉链二聚化序列等),其成员也是最多的,这使得它们在更大范围内接受各种信号<sup>[8,18]</sup>。本研究发现,在小麦成熟胚脱分化过程中检测到 3 个 AtMEKK1 类似基因、2 个 OsMAP3K $\alpha$  类似基因、6 个 OsMAP3K $\delta$ 1 类似基因、1 个 EDR1 基因出现非常活跃的表达变化,这些基因在脱分化过程中可能涉及多重信号途径的响应。

MAPK 级联途径在植物代谢活动中起着重要作用,但是 MAPK 活化的时间和数量最终决定了它在细胞中的含量,过度的活化可能会对植物体产生致命的影响<sup>[17]</sup>。因此必须存在着一个蛋白磷酸化负调控的分子机制来精确调控 MAPK 信号途径<sup>[24]</sup>。已有研究表明,蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)、蛋白磷酸酶 2C(PP2C)在 MAPK 级联的负调控中起重要作用<sup>[25]</sup>。PTP 在植物体中的主要靶蛋白是 MAPK,PTP 能够使 MAPK 去磷酸化失去活性<sup>[25,26]</sup>。本研究检测到 2 个编码 At-PTP1 类似基因显著上调表达,4 个编码 PP2C 类似基因中,BQ166188 出现显著上调,CA606233,CA646341,CK197380 均显著下调,表明这两个基因产物可能参与脱分化过程中 MAPK 级联的调控或脱分化过程中的其它信号转导。脱分化是细胞由相对静止的分化状态向剧烈运动状态裂变的过程,这个过程需要启动细胞内一系列重要的生化反应。这些生化反应又发生在细胞内不同部

位,而催化这些不同生化反应的细胞内部的基因表达变化、酶的活性和数量的变化等都需要不同的信号刺激,最终引起植物细胞甚至植物体特定的生理反应。MAPK 级联途径是细胞分裂信号感知、生长素、ABA 等激素信号转导的重要途径,本研究中 MAP3Ks、MAP2Ks、MAPKs 等相关基因在小麦成熟胚脱分化过程中发生了显著的表达变化,变化趋势和脱分化过程基本吻合,表明这些基因的产物在调控脱分化过程的众多事件中起着重要作用。由于 MAPK 级联之间以及和其它的信号途径之间均存在着交叉和节点,所以一种特定 MAPK 变化可能参与一种特定的信号途径,也可能是多种信号综合作用的结果。小麦成熟胚脱分化过程中 MAPK 级联相关激酶可能的作用方式如图 2。通过对小麦成熟胚脱分化过程中 MAPK 级联途径中相关基因的表达变化进行研究,将为揭示脱分化的分子机制提供更有利的证据。

#### 参考文献:

- [1] Fausto N, Campbell J S, Riehle K J. Liver regeneration [J]. *Hepatology*, 2006, 43(Suppl): 45-53.
- [2] Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, 5: 836-847.
- [3] Mizoguchi T, Gotoh Y, Nishida E, *et al.* Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinases activities in culture cell [J]. *Plant Journal*, 1994, 5: 111-122.
- [4] Tena G, Renaudin J P. Cryptozoic acidification but not auxin at physiological concentration is an activator of MAP Kinase in tobacco cells [J]. *Plant Journal*, 1998, 16: 173-182.
- [5] Mikolajczyk M, Awotunde O S, Muszynska G, *et al.* Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells [J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 165-178.
- [6] Mockaitis M, Howell S H. Auxin induces mitogenic activated protein kinase (MAPK) activation in roots of *Arabidopsis* seedlings [J]. *Plant Journal*, 2000, 24: 785-796.
- [7] Kovtun Y, Chiu W L, Zeng W K, *et al.* Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plant [J]. *Nature*, 1998, 395: 716-720.
- [8] MAPK Group. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature [J]. *Trends in Plant Science*, 2002, 7: 301-308.
- [9] Kim J A, Cho K, Singh R, *et al.* Rice OsACDR1 (*Oryza sativa* accelerated cell death and resistance 1) is a potential positive regulator of fungal disease resistance [J]. *Molecular Cell*, 2009, 28: 431-439.

- [10] Nicole M C, Hamel L P, Morency M J, *et al.* MAP-ping genomic organization and organ-specific expression profiles of poplar MAP kinases and MAP kinase kinases [J]. *BMC Genomics*, 2006, 7: 223.
- [11] Chen J Y, Yue R Q, Xu H X, *et al.* Study on plant regeneration of wheat mature embryos under endosperm-supported culture [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2006, 5: 572-578.
- [12] Arkin A, Ross J, McAdams H H. Stochastic kinetic analysis of developmental pathway bifurcation in phage lambda-infected *Escherichia coli* cells [J]. *Genetics*, 1998, 149: 1633-1648.
- [13] Li L, Roden J, Shapiro B E, *et al.* Reproducibility, fidelity, and discriminant validity of mRNA amplification for microarray analysis from primary hematopoietic cells [J]. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2005, 7: 48-56.
- [14] Collins J F. Gene chip analyses reveal differential genetic responses to iron deficiency in rat duodenum and jejunum [J]. *Biological Research*, 2006, 39: 25-37.
- [15] Borge L, Calderini O, Binarova P, *et al.* A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localised to the plane of cell division [J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 101-113.
- [16] Wilson C, Pfosser M, Jonak C, *et al.* Evidence for the activation of a MAP kinase upon phosphate-induced cell cycle re-entry in tobacco cells [J]. *Physiologia Plantarum*, 1998, 102: 532-538.
- [17] Marshall C J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation [J]. *Cell*, 1995, 80: 179-185.
- [18] Mishra N S, Tuteja R, Tuteja N. Signaling through MAP kinase networks in plants [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2006, 452: 55-68.
- [19] Zhang T, Liu Y, Yang T, *et al.* Diverse signals converge at MAPK cascades in plant [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, 44: 274-283.
- [20] Xu J, Li Y, Wang Y, *et al.* Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283: 26996-267006.
- [21] Calderini O, Glabi N, Bergounioux C, *et al.* A novel tobacco mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase, NtMEK1, activates the cell cycle-regulated p43Ntf6 MAP kinase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 18139-18145.
- [22] Melikant B, Giuliani C, Halbmayr-Watzina S, *et al.* The *Arabidopsis thaliana* MEK AtMKK6 activates the MAP kinase AtMPK13 [J]. *FEBS Letters*, 2004, 576: 5-8.
- [23] Takahashi F, Yoshida R, Ichimura K, *et al.* The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19: 805-818.
- [24] Martin H, Flandez M, Nombela C, *et al.* Protein phosphatases in MAPK signaling: we keep learning from yeast [J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 58: 6-16.
- [25] Tena G, Asai T, Chiu W L, *et al.* Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades [J]. *Current Opinion Plant Biology*, 2001, 4: 392-400.
- [26] Huang Y, Li H, Gupta R, *et al.* ATMPK4, an *Arabidopsis* homolog of mitogen-activated protein kinase, is activated in vitro by AtMEK1 through threonine phosphorylation [J]. *Plant Physiology*, 2000, 122: 1301-1310.