

花生MAPKKK基因的鉴定和盐胁迫响应分析

孔祥远¹, 秦贵龙¹, 尹秀波², 乔利仙¹, 王晶珊¹, 隋炯明^{1,*}, 李运祥^{3,*}

¹青岛农业大学生命科学院, 山东省高校植物生物技术重点实验室, 山东青岛266109; ²山东省农业技术推广总站, 济南250013; ³泰山学院生物与酿酒工程学院, 山东泰安271000

摘要: MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase)在植物抗逆胁迫中起重要作用。为分析花生中MAPKKK基因的情况, 本试验对耐盐花生(*Arachis hypogaea*)突变体(S2)和对照(S4)的叶片进行RNA测序分析, 筛选出了19个具有完整开放阅读框的MAPKKK基因。它们位于花生A组野生种的8条染色体上, 不同成员的氨基酸残基数、外显子数目差异很大。聚类分析表明19个花生MAPKKK基因能聚到MEKK和Raf两个亚家族。我们利用S2和S4构建了盐胁迫处理前后的表达谱, 筛选出4个受盐胁迫诱导表达的MAPKKK基因, 分别属于MEKK亚家族(3个)和Raf亚家族(1个)。该研究为花生MAPKKK基因的功能研究和利用提供参考。

关键词: 花生; RNA测序; MAPKKK; 盐胁迫

MAPKKK [mitogen-activated protein kinase (丝裂原活化蛋白激酶) kinase kinase]、MAPKK和MAPK等激酶组成MAPK级联反应, 每种激酶都具有众多成员, 这种形式能够迅速有效地对多种外界刺激做出响应, 进而传递特异性信号(张振才等2014)。其中MAPKKK (MEKK或MKKK)位于MAPK级联途径的最上游, 担负着接受外界信号并传递给下游MAPKK的任务, 从而调节植物的防御反应, 如抵御盐碱、干旱、低温等非生物胁迫, 它是组成植物体内防御信号途径的重要部分(Nakagami等2004)。模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) MAPKKK家族可分为MEKK、ZIK和Raf三个亚家族(Jonak等2002)。与ZIK和Raf亚家族相比, MEKK亚家族有较少的保守序列(Rao等2010), 而Raf亚家族和ZIK亚家族蛋白有一个C端激酶结构域和一个长的N端的调控结构域(Ichimura等2002; Rodriguez等2010)。

MAPKKK基因参与植物抵抗多种生物胁迫和非生物胁迫(Hadiarto等2006; Kannan等2012; Asai等2002)。此外, MAPKKK还调控植物的生长发育, 例如, 在烟草(*Nicotiana tabacum*)中发现MAPKKK基因NPKI具有调控细胞分化和细胞壁形成的作用(Yasunori等1998)。

目前尚未有花生MAPKKK基因功能研究的报道。为分析花生MAPKKK基因的情况, 我们构建了花生叶片转录组文库, 筛选花生MAPKKK家族基因, 并进行基因结构分析、染色体定位和聚类分析; 然后利用盐胁迫处理前后的表达谱, 分析了MAPKKK基因在盐胁迫处理前后表达量的变化,

为了解花生MAPKKK基因和盐胁迫之间的关系提供参考。

材料与方法

1 试验材料

利用平阳霉素作为化学诱变剂, 对花生(*Arachis hypogaea* L.)品种‘花育20’(S4)进行离体诱变, 并在含羟脯氨酸的MSB₅培养基中进行定向筛选, 经过多年的0.7% NaCl发芽筛选后获得1个稳定遗传的耐盐突变体(S2)。

2 试验方法

2.1 花生叶片转录组和表达谱数据库构建

用1.5% NaCl溶液对生长1个月的耐盐突变体(S2)和对照(S4)植株进行处理, 并在0、6、12、24和48 h取叶片, 分别将S2各时间段的样品命名为S2_0、S2_6、S2_12、S2_24和S2_48; 将S4各时间段的样品命名为S4_0、S4_6、S4_12、S4_24和S4_48, 每个样品包括2次生物学重复, 所有20个样品混合后构建无参转录组文库。用NR、NT、Swiss-Prot、Pfam、KOG、GO和KEGG这七大数据库进行基因功能注释。

对上述20个样品分别进行数字化表达谱测序, 构建表达谱数据库, 并以上述转录组数据库为参考, 对表达谱数据库中获得的unigene序列进行分析。

收稿 2016-12-01 修定 2017-04-07

资助 国家自然科学基金(31571705、31301356和31471542)、山东省科技发展计划(2014GNC110002)和泰安市科技局项目(20132088)。

* 共同通讯作者(E-mail: suijiongming@163.com; tsuyxli@163.com)。

2.2 *MAPKKK*基因的筛选和分析

根据上述七大数据库的基因功能预测, 搜索 *MAPKKK* 基因。从花生A组野生种全基因组数据库下载序列, 利用生物信息学软件进行比对, 寻找完整的开放阅读框, 根据比对结果进行外显子-内含子结构分析, 并预测 *MAPKKK* 蛋白的分子质量和理论等电点。根据与A组野生种比对后的结果, 绘制每个 *MAPKKK* 基因在A组染色体上的位置。

2.3 系统发育树的构建及部分保守基序分析

通过Clustal X程序对 *MAPKKK* 蛋白进行多序列比对分析, 序列联配结果使用MEGA 7.0程序。采用邻接法生成 *MAPKKK* 基因的系统进化树, bootstrap值设置为1 000。使用MEME 4.11.1在线分析系统对该类蛋白进行保守基序(motif)预测。

2.4 *MAPKKK*基因的盐胁迫响应分析

在胁迫处理前后, 将S2或S4样品中某一基因在任意2个时间段间的表达量进行比较, 如果调整后的 $P < 0.05$, 即达到显著水平, 则认为该基因对盐胁迫有响应。根据FPKM (每千个碱基转录每百万映射读取的片段, expected number of fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced)值, 利用软件HemI 1.0制作热图。

2.5 基因表达的荧光定量PCR验证

样品在ABI Stepone plus型荧光定量PCR仪上进行反应, 20 μL 体系包括: 10 μL 2 \times SYBR Green PCR Master Mix、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 正反向引物各0.4 μL 、20 ng反转录产物。扩增程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min; 接着进入45个循环反应, 每个循环包括95 $^{\circ}\text{C}$ 7 s、57 $^{\circ}\text{C}$ 10 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s; 每个反应设3个复孔。以花生 *18S rRNA* 基因为内参, 扩增正向引物序列为5'-ATTCCTAGTAAGCGCGAGTCATCAG-3', 反向引物序列为5'-CAATGATCCTTCCGCAG-GTTCAC-3'; c9322_g1基因的正向引物序列为5'-CTTTTCTATTCCAACCGCAGC-3', 反向引物序列为5'-AAGCCAACCCAGATTCAGT-3'; c33788_g2基因的正向引物序列为5'-GGGAAGT-GCTTGAGGAGTGA-3', 反向引物序列为5'-TTGTGGGTGTGTCCAAATCA-3'; c36638_g1基因的正向引物序列为5'-AGGATTGCGGAGATT-

GTTGC-3', 反向引物序列为5'-TTGGACCCGTGG-TAGTGCTT-3'; c41834_g1基因的正向引物序列为5'-TGACCCAATAAGAGTTCAAGCG-3', 反向引物序列为5'-GATAAATCCCACAGTCATTCTA-CCT-3'。相对表达量的计算参考Livak和Schmittgen (2001)的 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法。

实验结果

1 花生 *MAPKKK* 基因家族的鉴定及其在染色体位置上的分布

根据上述七大数据库的基因功能预测结果及SMART在线工具分析, 我们从花生叶片转录组数据库筛选出了26个 *MAPKKK* 基因。将其与公布的花生A组野生种基因组序列进行比对, 其中c1377_g1、c4115_g1、c30079_g1、c32676_g2、c35517_g1这5个基因在A组中没有完整的阅读框, 因而删除了这5个基因。c9322_g1与c32676_g1、c50509_g1与c59487_g1阅读框相同, 因而将c32676_g1和c59487_g1也删除, 最终获得19个具有完整开放阅读框的 *MAPKKK* 基因。然后对这19个基因在染色体的位置、氨基酸数目、亚细胞定位、外显子个数和等电点进行了分析, 结果列于表1。

利用软件预测基因的亚细胞定位, 发现这19个基因编码的产物都能定位到细胞核或者细胞质中; 这些基因编码蛋白质的氨基酸数目差别很大, 范围为383~1 164 aa; 等电点范围为4.66~10.11; 分子质量范围为38 111~153 274 Da; 它们的外显子的个数相差甚大, 如c30256_g1只有1个外显子, 而c43540_g1多达25个外显子(表1和图1)。

19个花生 *MAPKKK* 基因共分布于A组野生种的8条染色体上, 多数位于3、6和10号染色体上, 分别有4、3和3个基因; 2和7号染色体上暂时没有发现 *MAPKKK* 基因。3、4和6号染色体上的 *MAPKKK* 基因连锁比较紧密, 每条染色体上两两基因间的物理距离均在2 Mb以内, 其中6号染色体5 Mb范围内有c41834_g1、c28146_g1和c29143_g1三个 *MAPKKK* 基因, 而c28146_g1和c29143_g1之间仅有几百个碱基对的距离(表1和图2)。

2 花生 *MAPKKK* 基因的聚类分类

拟南芥中的 *MAPKKK* 基因可分为MEKK、Raf和Zip三个亚族(Jonak等2002)。我们将筛选到

表1 十九个花生MAPKKK基因的基本信息

Table 1 The basic information of 19 MAPKKK genes in peanut

基因编号	所在染色体	亚细胞定位	氨基酸数目	分子质量/Da	等电点	外显子数目
c22267_g1	1	细胞核	605	65 867	8.46	11
c26477_g1	3	细胞核	890	97 759	9.50	11
c41874_g2	3	细胞核	673	77 017	9.63	12
c42067_g1	3	细胞核	671	74 800	9.56	9
c43540_g1	3	细胞核	1 398	153 274	6.44	25
c30256_g1	4	细胞质	508	38 111	6.77	1
c33788_g2	4	细胞质	383	42 258	4.66	2
c1745_g1	5	细胞核	841	90 296	10.11	10
c50509_g1	5	细胞核	657	72 622	9.36	9
c28146_g1	6	细胞核	470	53 014	8.66	10
c29143_g1	6	细胞核	487	53 911	8.03	10
c41834_g1	6	细胞质/细胞核	634	70 493	7.24	5
c43139_g1	8	细胞质	483	52 486	5.50	12
c36638_g1	8	细胞核	562	61 770	4.94	8
c43885_g1	9	细胞核	871	93 998	9.74	11
c44471_g1	9	细胞核	1 164	129 342	6.45	11
c41874_g1	10	细胞核	510	56 052	9.63	11
c9322_g1	10	细胞核	507	56 324	5.87	8
c44495_g1	10	细胞核	601	65 673	6.45	9

的19个花生MAPKKK基因与拟南芥的MAPKKK基因进行了多重序列比对和系统进化分析, 结果表明19个花生的MAPKKK基因只聚到拟南芥的MEKK和Raf两个亚族中, 分别包含15和4个MAPKKK基因。c44471_g1、c41834_g1、c41874_g1和c41874_g2这4个基因聚在Raf亚族中, 且和Raf13以及Raf40亲缘关系更近(图3)。

对花生MEKK亚族中的基因进行同源性分析发现, 除了c28146_g1和c43540_g1这2个基因外, 其他基因编码蛋白都包含报道的保守基序G (T/S) PX (F/Y/W) MAPEV (Xia等2007) (图4)。拟南芥Raf亚族中大多数成员都含有保守基序GTXX (W/Y) MAPE (Xia等2007), 但个别成员没有这个基序, 如Raf13和Raf40; 花生的c44471_g1、c41834_g1、c41874_g1、c41874_g2这4个基因和Raf13、Raf40聚到一类, 它们都没有这个保守的基序(图5)。

通过MEME 4.11.1在线分析软件对19个MAPKKK基因进行基序分析, 共发现10个基序。c9322_g1与c36638_g1含有全部的基序; c42067_g1、c22267_g1、c29143_g1、c50509_g1和c26477_g1这5个基因含有除基序10之外的其余9个基序。而

Raf亚族的成员一般含有较少的基序, 如c41834_g1和c41874_g2只含有1和2个基序(图6)。

3 花生MAPKKK基因的盐胁迫分析

为分析19个花生MAPKKK基因在盐胁迫处理前后的表达情况, 我们根据调整后的P值, 筛选出4个受盐胁迫诱导表达的MAPKKK基因, 分别是c9322_g1、c33788_g2、c36638_g1和c41834_g1。其中c9322_g1和c41834_g1只在S4中受盐胁迫诱导表达, 而其余2个MAPKKK基因在S2和S4中均受盐胁迫诱导表达(图7)。c9322_g1与c36638_g1在S2和S4中的表达的变化规律相同, 表达趋势分别为上调-上调-下调-下调和下调-上调-下调-上调。而c33788_g2与c41834_g1在S2和S4的表达趋势有差别, c33788_g2在S2的表达趋势为上调-下调-上调-下调, 在S4为下调-下调-上调-下调; c41834_g1在S2的表达趋势为下调-上调-下调-下调, 在S4为上调-上调-下调-上调(图8)。

4 基因表达的荧光定量PCR验证

我们选取了上述4个受盐胁迫诱导表达的MAPKKK基因, 以花生18S rRNA基因为内参, 进行荧光定量PCR验证, 结果与转录组测序(RNA sequencing, RNA-Seq)分析数据基本一致(图9)。

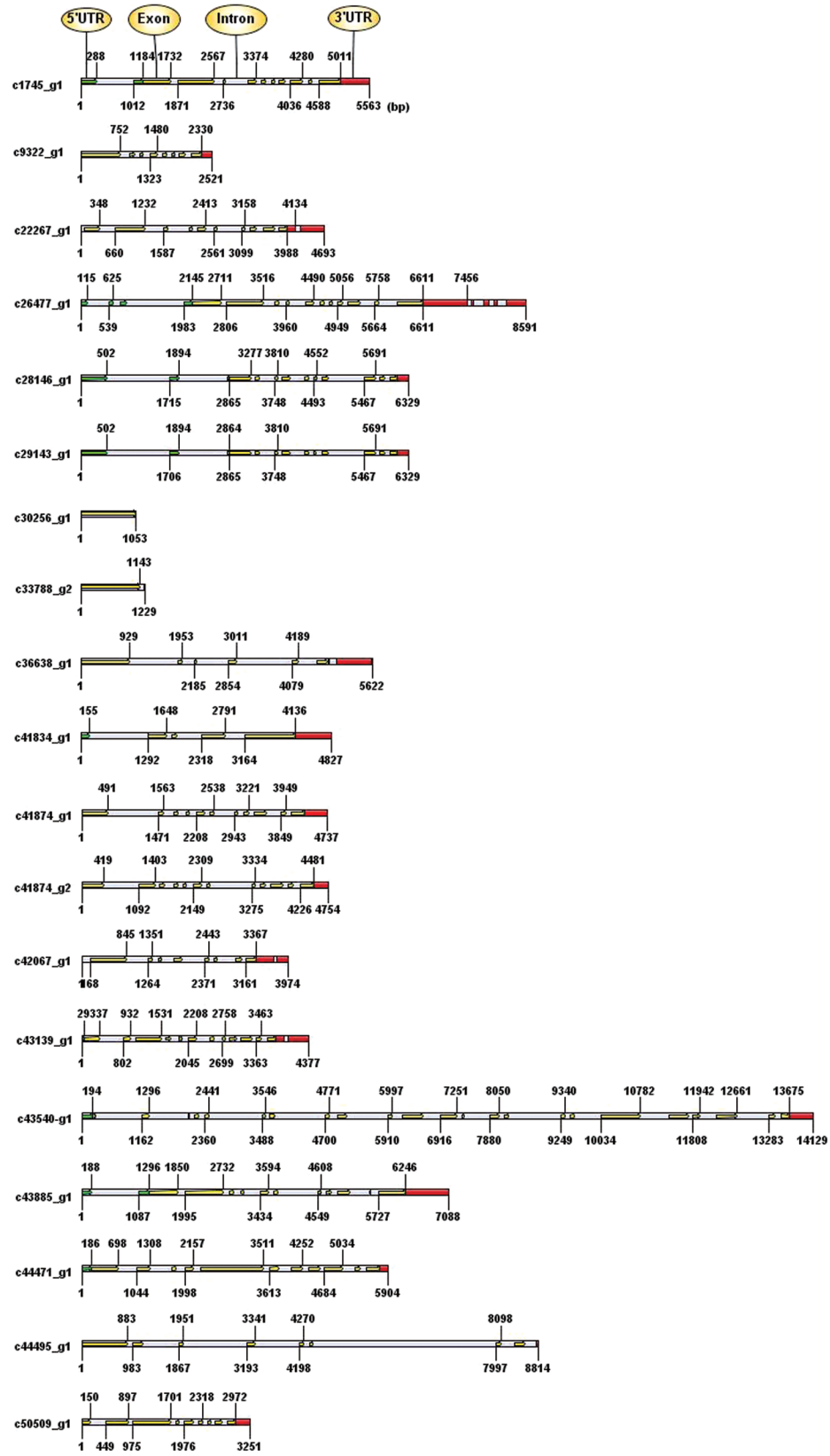


图1 十九个花生MAPKKK基因的结构示意图

Fig.1 The structure diagram of 19 MAPKKK genes in peanut

UTR: 非翻译区; Exon: 外显子; Intron: 内含子。

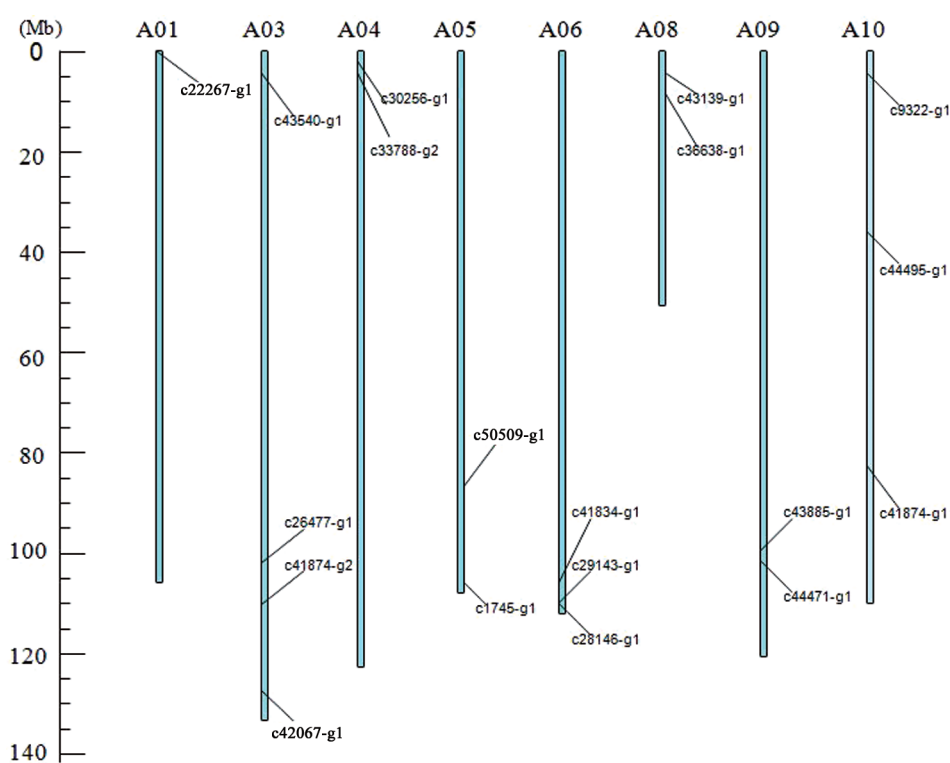


图2 十九个MAPKKK基因在花生A基因组染色体上的位置

Fig.2 Positions of 19 MAPKKK genes on chromosome of A genome in peanut

讨 论

MAPKKK基因参与的级联反应与植物抵抗生物和非生物胁迫有着密切关系。如在拟南芥中Raf5突变体比野生型更加耐盐(Gao和Xiang 2008);但在另外的报道中发现某些MAPKKK基因对拟南芥的耐盐性起负调控作用(Gao和Xiang 2008)。棉花(*Gossypium hirsutum*)的GhMAPKKK49基因对高盐、干旱及低温等非生物胁迫有明显响应,此外该基因还受生物胁迫的诱导表达(Liu等2016)。在玉米(*Zea mays*)中研究发现Raf家族的某些成员与抗病性有关;而ZIK家族的某些成员的表达及所参与的级联反应可能与玉米的抗旱性有关(Wei等2014)。小麦(*Triticum aestivum*)中Tamekk14、TaRaf10、TRraf34和TaRaf53基因对盐胁迫有响应;TaRaf87和TaRaf105基因能被干旱条件诱导表达;而TaRaf36、TaRaf49和TaRaf112基因受冷和热胁迫诱导表达(Wang等2016)。葡萄(*Vitis vinifera*)中Vvimapkkk32、Vvimapkkk34、Vvimapkkk39、Vvimapkkk49、Vvimapkkk46、Vvimapkkk50等多个基因参与生物和非生物胁迫反应(Wang等2014)。在西瓜(*Citrullus la-*

natus)中MAPKKK多个成员也对非生物胁迫(如干旱、盐、冷和热治疗)和生物胁迫[如感染尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)]有响应(Song等2015)。黄瓜(*Cucumis sativus*)中CsZIK家族的基因对非生物胁迫有一定的响应(Wang等2015)。番茄(*Solanum lycopersicum*)中的SIMAPKKK51、SIMAPKKK53、SIMAPKKK55基因在受到非生物胁迫(干旱、冷、盐等)时表达量增加了至少100倍,而SIMAPKKK45、SIMAPKKK 48和SIMAPKKK 49基因在受到丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)胁迫时表达量增加了10倍以上(Wu等2014)。我们在花生中也检测到4个受盐胁迫诱导表达的MAPKKK基因。由此可见,MAPKKK基因在植物的抗逆胁迫中发挥了重要作用。

本研究通过RNA-Seq分析,筛选出19个MAPKKK基因,位于花生A组野生种的8条染色体上,不同染色体上的MAPKKK基因数目有差异。聚类分析表明19个花生MAPKKK基因能聚到MEKK和Raf两个亚家族,而Zip亚家族没有发现MAPKKK基因,可能是由于我们所获得的MAPKKK基因只是来源于叶片组织,只检测到部分MAPKKK基因;或者是

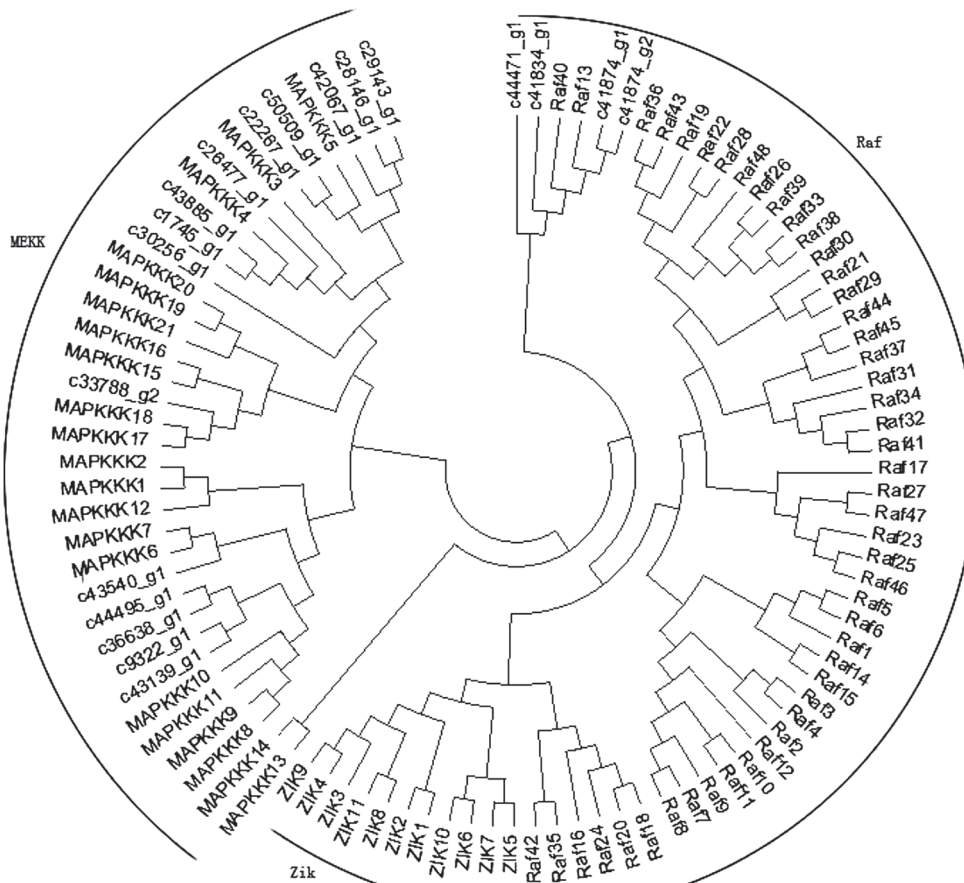


图3 拟南芥和花生MAPKKK基因的进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of MAPKKK genes in *A. thaliana* and peanut

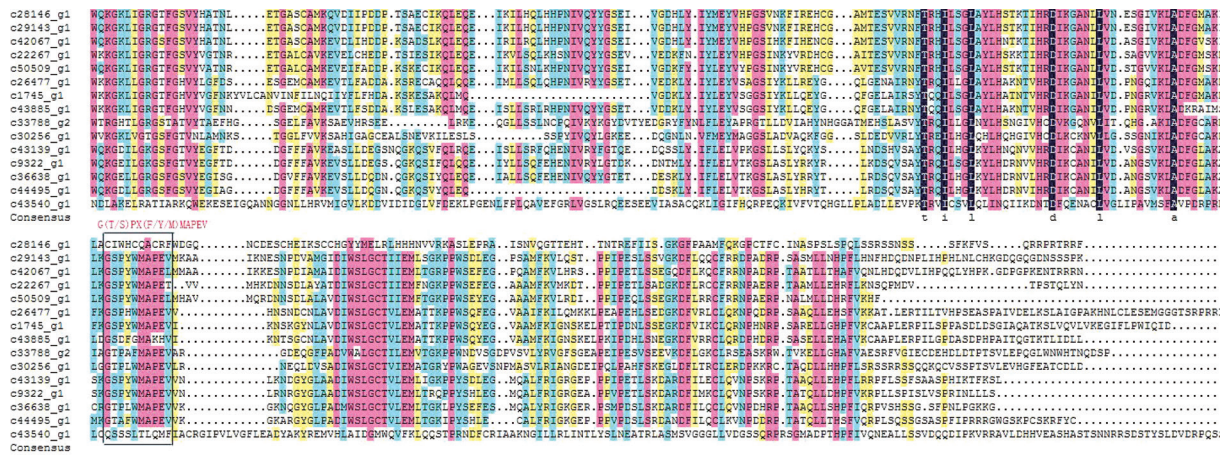


图4 花生MEKK亚族成员的氨基酸序列比对

Fig.4 Alignment of amino acid sequences of members from MEKK subgroup in peanut

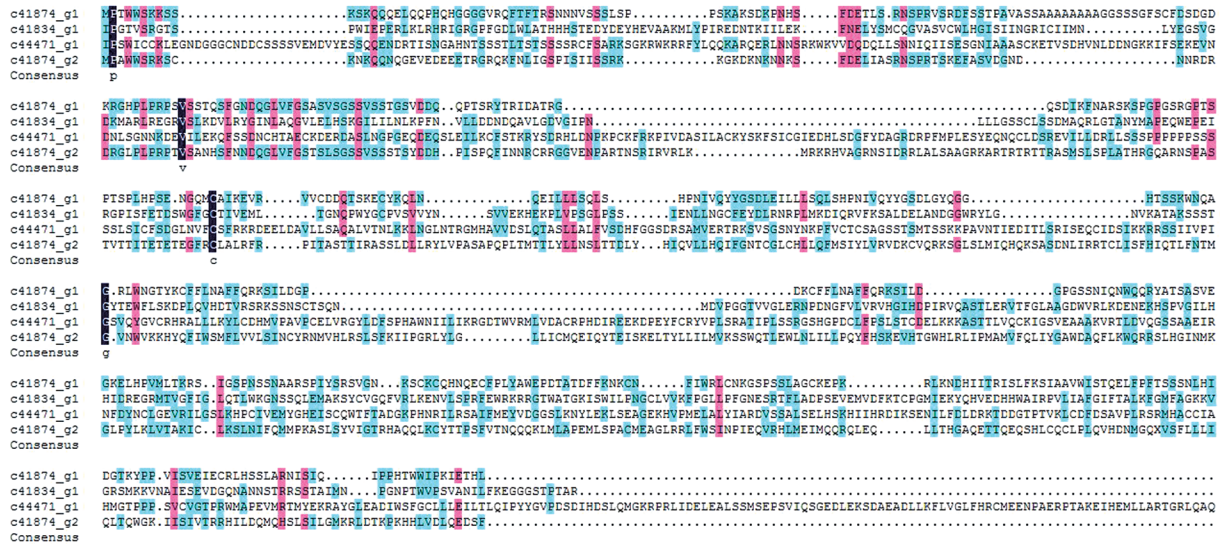


图5 花生Raf亚族成员的氨基酸序列比对

Fig.5 Alignment of amino acid sequences of members from Raf subgroup in peanut

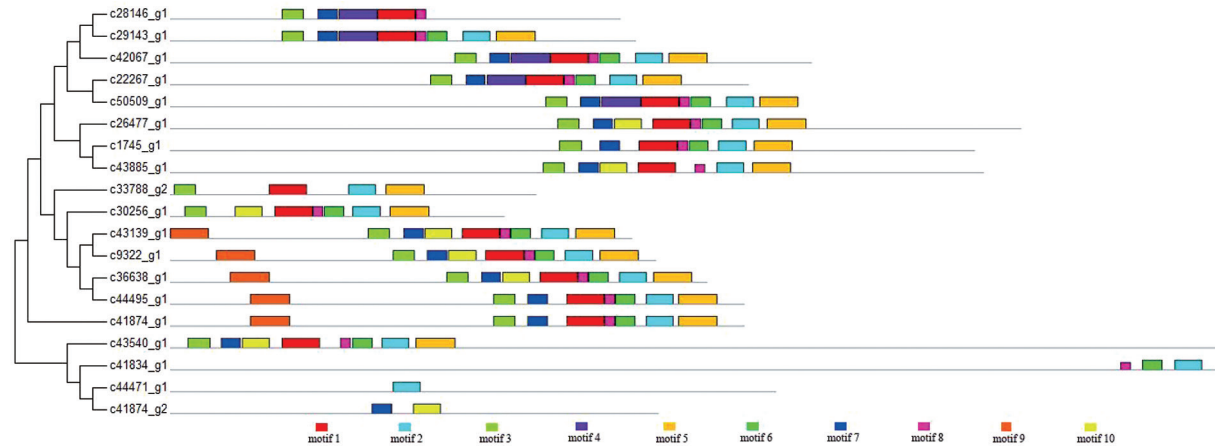


图6 十九个花生MAPKKK基因的基序分析

Fig.6 Motif analysis of 19 MAPKKK genes from peanut

某些MAPKKK基因表达量比较低, 没有检测到。利用耐盐突变体(S2)和对照(S4)构建了盐胁迫处理前后各时间段的表达谱数据, 进行基因盐胁迫表达分析, 利用调整后的P值, 筛选出4个受盐胁迫诱导表达的MAPKKK基因, 其中1个属于Raf亚家族(c41834_g1), 其余3个基因属于MEKK亚家族, 这些MAPKKK基因可能在花生抵御盐胁迫中发挥着重要作用。本研究通过转录组和表达谱分析从基因组水平上筛选出了花生中与耐盐相关的MAPKKK基因, 为进一步研究它们的功能以及利用它们来改良花生的耐盐性提供了依据。

参考文献

Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415 (6875): 977–983

Gao L, Xiang CB (2008). The genetic locus At1g73660 encodes a putative MAPKKK and negatively regulates salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 67: 125–134

Hadiarto T, Nanmori T, Matsuoka D, Iwasaki T, Sato KI, Fukami Y, Azuma T, Yasuda T (2006). Activation of *Arabidopsis* MAPK kinase kinase (AtMEKK1) and induction of AtMEKK1-AtMEK1 pathway by wounding. *Planta*, 223: 708–713

Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A,

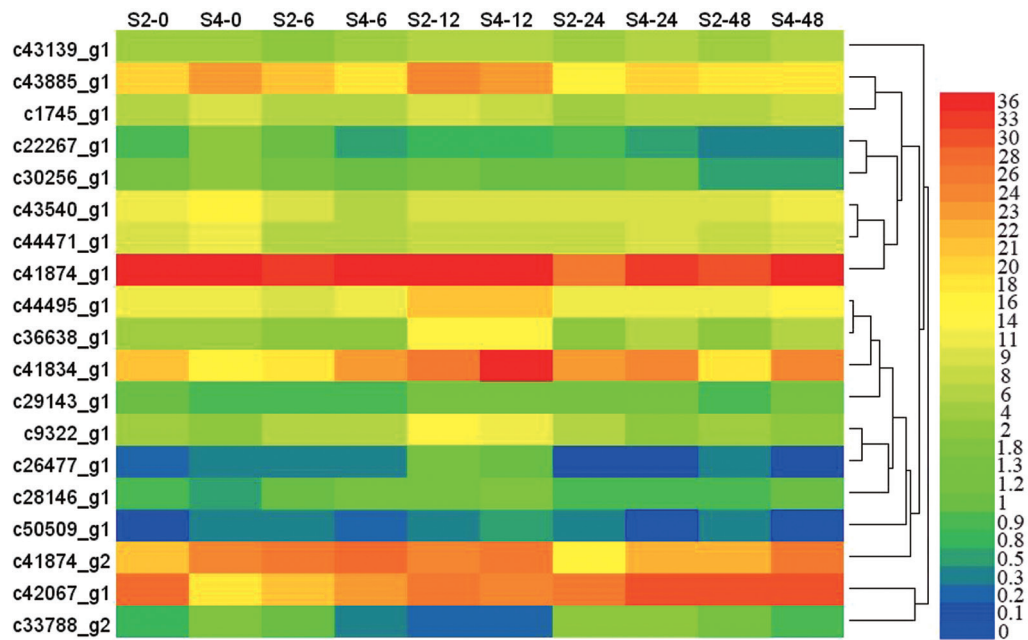


图7 十九个MAPKKK基因在盐胁迫处理前后的表达量

Fig.7 Expression levels of 19 MAPKKK genes before and after salinity stress
基因的表达量用FPKM表示。

- Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, et al (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci*, 7: 301–308
- Jonak C, Ökrész L, Bögre L, Hirt H (2002). Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 5: 415–424
- Kannan P, Pandey D, Gupta AK, Punetha H, Taj G, Kumar A (2012). Expression analysis of MAP2K9 and MAPK6 during pathogenesis of *Alternaria blight* in *Arabidopsis thaliana* ecotype *Columbia*. *Mol Biol Rep*, 39 (4): 4439–4444
- Liu DD, Zhu M, Hao LL, Chen XB, Gao Y, Guo XQ, Li H (2016). *GhMAPKKK49*, a novel cotton (*Gossypium hirsutum* L.) MAPKKK gene, is involved in diverse stress responses. *Acta Physiol Plant*, 38: 13
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25: 402–408
- Nakagami H, Kiegel S, Hirt H (2004). OMTKI, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *J Biol Chem*, 279: 26959–26966
- Rao KP, Richa T, Kumar K, Raghuram B, Sinha AK (2010). *In silico* analysis reveals 75 members of mitogen-activated protein kinase kinase gene family in rice. *DNA Res*, 17 (3): 139–153
- Rodriguez MCS, Petersen M, Mundy J (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 61: 621–649
- Song QM, Li DY, Dai Y, Liu SX, Huang L, Hong YB, Zhang HJ, Song FM (2015). Characterization, expression patterns and functional analysis of the MAPK and MAPKK genes in watermelon (*Citrullus lanatus*). *BMC Plant Biol*, 15: 298
- Wang G, Arianna L, Annalisa P, Wang M, Liang YH, Ma YC, Cheng ZM (2014). Genome-wide identification and analysis of mitogen activated protein kinase kinase kinase gene family in grapevine (*Vitis vinifera*). *BMC Plant Biol*, 14: 219
- Wang J, Pan CT, Wang Y, Ye L, Wu J, Chen LF, Zou T, Lu G (2015). Genome-wide identification of MAPK, MAPKK, and MAPKKK gene families and transcriptional profiling analysis during development and stress response in cucumber. *BMC Genomics*, 16: 386
- Wang M, Yue H, Feng KW, Deng PC, Song WN, Nie XJ (2016). Genome-wide identification, phylogeny and expressional profiles of mitogen activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) gene family in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Genomics*, 17: 668
- Wei KF, Wang YM, Zhong XJ, Pan S (2014). Protein kinase structure, expression and regulation in maize drought signaling. *Mol Breeding*, 34 (2): 583–602
- Wu J, Wang J, Pan CT, Guan XY, Wang Y, Liu SY, He YJ, Chen JL, Chen LF, Lu G (2014). Genome-wide identification of MAPKK and MAPKKK gene families in tomato and transcriptional profiling analysis during development and stress response. *PLoS ONE*, 9 (7): e103032
- Xia Y, Wang J, Xu S, Johnson GL, Hunter T, Lu Z (2007). MEKK1 mediates the ubiquitination and degradation of c-Jun in response

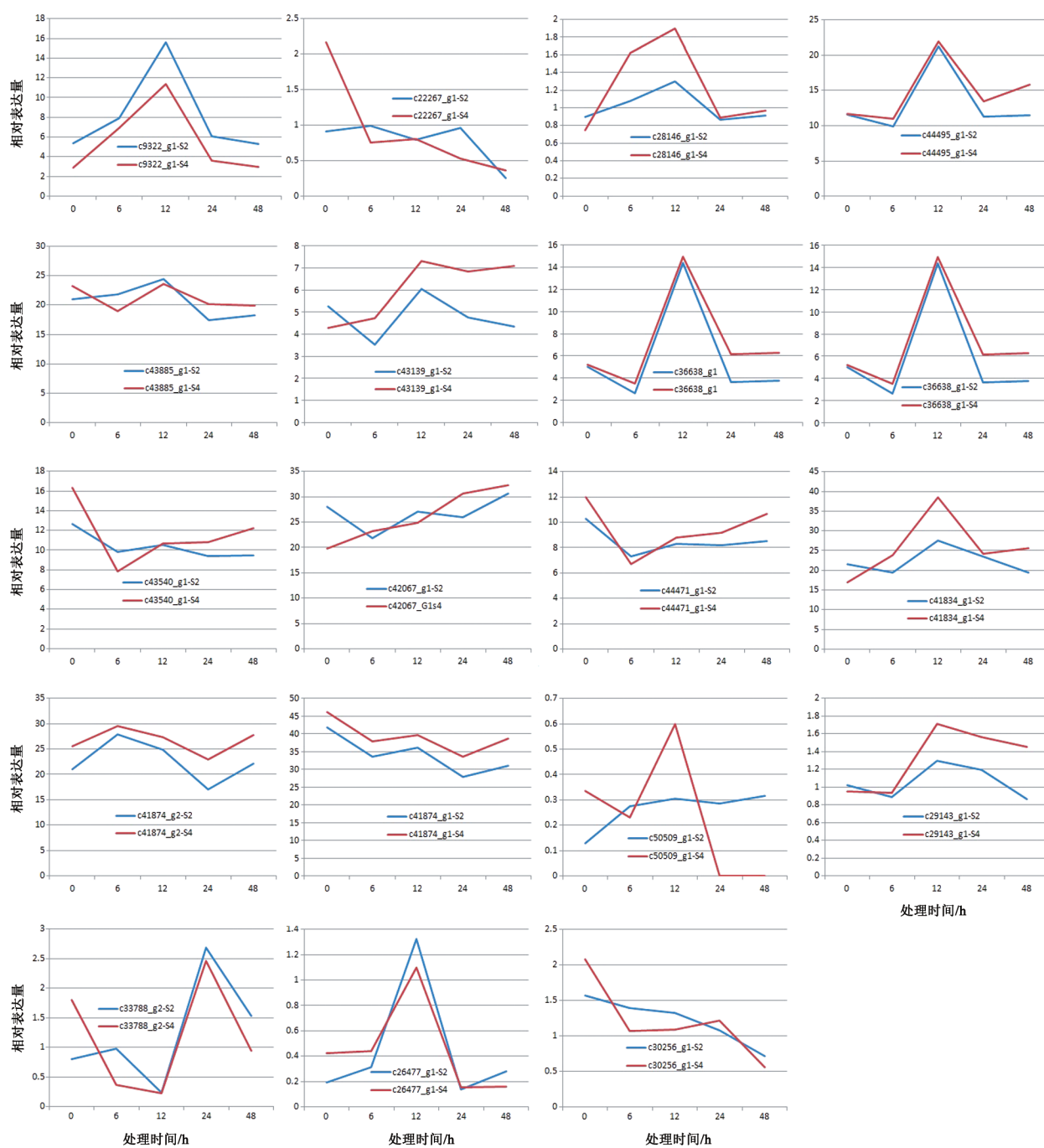


图8 花生MAPKKK基因表达趋势图

Fig.8 Expression run chart of MAPKKK genes from peanut

to osmotic stress. *Mol Cell Biol*, 27 (2): 510–517

Yasunori M, Marina N, Kayoko M, Hiroharu B, Masaki I, Takashi S, Ryuichi N (1998). MAPKKK-related protein kinase NPK1: regulation of the M phase of plant cell cycle. *J Plant Res*, 111 (2): 243–246

Zhang ZC, Liang Y, Li C (2014). Review on plant MARK cascades and their functions. *J Northwest A&F Univ-Nat Sci*, 42 (4): 207–217 (in Chinese with English abstract) [张振才, 梁燕, 李翠 (2014). 植物MAPK级联途径及其功能研究进展. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 42 (4): 207–217]

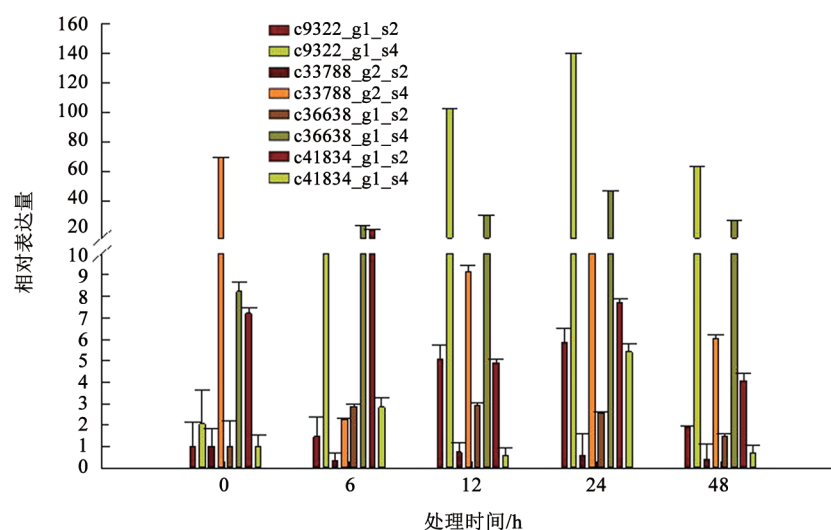


图9 花生MAPKKK基因表达的荧光定量PCR验证

Fig.9 Expression validation of *MAPKKK* genes from peanut by real-time PCR

Identification and salinity stress-responsive analysis of *MAPKKK* genes in peanut

KONG Xiang-Yuan¹, QIN Gui-Long¹, YIN Xiu-Bo², QIAO Li-Xian¹, WANG Jing-Shan¹, SUI Jiong-Ming^{1,*}, LI Yun-Xiang^{3,*}¹College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University/Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong, Qingdao, Shandong 266109, China; ²The Agricultural Technology Extension Station of Shandong Province, Jinan 250013, China; ³College of Biology and Brewing Engineering, Taishan College, Taian, Shandong 271000, China

Abstract: Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (*MAPKKK*) plays an important role in resisting biotic and abiotic stresses in plants. In order to analyze *MAPKKK* genes in peanut (*Arachis hypogaea*), RNA sequencing (RNA-Seq) was conducted with the use of leaves of a salinity tolerant peanut mutant (S2) and its control (S4) as materials in this experiment. Nineteen *MAPKKK* genes with complete open reading frame, distributed throughout 8 chromosomes of A genome, were screened. The numbers of their amino acid residues and of exons were significantly different among the different members. Clustering analysis showed that these 19 *MAPKKK* genes were distributed to MEKK and Raf subgroups. To analyze the response to salinity stress of these 19 *MAPKKK* genes, digital gene expression profiles were constructed with S2 and S4 before and after salinity treatment. The results show that 4 *MAPKKK* genes belonging to MEKK (3) and Raf (1) subgroups were responsive to salinity stress. This study could provide basis for functional research and the application of *MAPKKK* genes in peanut.

Key words: peanut; RNA sequencing; *MAPKKK*; salinity stress

Received 2016-12-01 Accepted 2017-04-17

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 31571705, 31301356 and 31471542), Shandong Province Science and Technology Development Plan Project (Grant No. 2014GNC110002), and the Project of Science and Technology Bureau of Taian (Grant No. 20132088).

*Co-corresponding authors (E-mail: suijiongming@163.com; tsuyxli@163.com).