

doi:10.3969/j.issn.1673-9833.2023.06.010

东方百合两个 SERKs 基因的克隆及表达分析

郑梓唯^{1,2}, 荣朵艳^{1,2}, 廖晓珊^{2,3}, 张邦跃^{1,2}

(1. 湖南工业大学 生命科学与化学学院, 湖南 株洲 412007; 2. 百合种质资源创新与深加工湖南省工程研究中心, 湖南 株洲 412007; 3. 株洲市农业科学研究所, 湖南 株洲 412007)

摘要: 体细胞胚发生类受体激酶 (somatic embryo genesis receptor-like kinases, SERKs) 能够感受并传递细胞外信号, 在植物的生长发育等生理过程中起着重要作用。基于东方百合“西伯利亚”的转录组数据, 克隆了两个百合 SERK 同源基因, *LoSERK1* 和 *LoSERK2*。*LoSERK1* 的开放阅读框全长为 1 875 bp, 编码 624 个氨基酸, 包含 53 个潜在磷酸化位点。*LoSERK2* 的开放阅读框全长为 1 887 bp, 编码 628 个氨基酸, 包含 55 个潜在磷酸化位点。*LoSERKs* 与拟南芥、水稻、茶树等植物 SERKs 氨基酸序列相似性均超过 90%。系统进化树分析结果表明, 百合的 *LoSERKs* 与拟南芥的 *AtSERK1*、*AtSERK2* 及水稻的两个 *OsSERKs* 分在同一组。实时定量 PCR 分析表明, *LoSERK1* 在花瓣及花药中的相对表达量都较高, 而 *LoSERK2* 在开放的花瓣中相对表达含量较高, 推测 *LoSERKs* 参与了花粉发育、花器官脱落功能的调控。

关键词: 百合; 体细胞胚发生类受体激酶; 生物信息学; 表达分析

中图分类号: S682

文献标志码: A

文章编号: 1673-9833(2023)06-0074-09

引文格式: 郑梓唯, 荣朵艳, 廖晓珊, 等. 东方百合两个 SERKs 基因的克隆及表达分析 [J]. 湖南工业大学学报, 2023, 37(6): 74-82.

Cloning and Expression Analysis of Two SERKs Genes in Oriental Lily

ZHENG Ziwei^{1,2}, RONG Duoyan^{1,2}, LIAO Xiaoshan^{2,3}, ZHANG Bangyue^{1,2}

(1. College of Life Science and Chemistry, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China;

2. Lily Germplasm Resources Innovation and Deep Processing Hunan Engineering Research Center, Zhuzhou Hunan 412007, China; 3. Zhuzhou Institute of Agricultural Sciences, Zhuzhou Hunan 412007, China)

Abstract: The ability of sensing and transmitting extracellular signals exhibited by somatic embryo genesis receptor-like kinases (SERKs) plays an important role in plant physiological processes such as growth and development. Base on the transcriptome data of *Lilium* oriental hybrids ‘Siberia’, two SERK genes of *Lilium*, *LoSERK1* and *LoSERK2*, have thus been cloned. The open reading frame of *LoSERK1* has a total length of 1875 bp, encoding 624 amino acids and containing 53 potential phosphorylation sites, while the open reading frame of *LoSERK2* has a total length of 1 887 bp, encoding 628 amino acids and containing 55 potential phosphorylation sites. The amino acid sequence similarity exceeds 90% between *LoSERKs* and plant SERKs such as *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* and *Camellia sinensis*. The phylogenetic tree analysis shows that the *LoSERKs* of *Lilium* are in the same group as the

收稿日期: 2022-08-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32100576); 湖南省自然科学基金资助项目 (2021JJ50034); 湖南省教育厅青年基金资助项目 (20C0632); 株洲市科技人才托举工程基金资助项目 (2019TJ-06)

作者简介: 郑梓唯 (1997-), 男, 湖南湘阴人, 湖南工业大学硕士生, 主要研究方向为植物分子育种,

E-mail: zheng1875354432@163.com

通信作者: 张邦跃 (1985-), 男, 广东丰顺人, 湖南工业大学讲师, 博士, 硕士生导师, 主要研究方向为观赏植物育种,

E-mail: cauzhang@163.com

AtSERK1 and *AtSERK2* of *Arabidopsis thaliana*, and two *OsSERKs* of *Camellia sinensis*. A real time quantitative PCR analysis shows that *LoSERK1* is characterized with a high relative expression level in both petals and anthers, while the relative expression level of *LoSERK2* is high in open petals. It is speculated that *LoSERKs* are involved in the regulation of pollen development and floral organ abscission.

Keywords: *Lilium*; somatic embryo genesis receptor-like kinases; bioinformatics; expression analysis

1 研究背景

体细胞胚发生类受体激酶 (somatic embryo genesis receptor-like kinases, SERKs) 属于富含亮氨酸重复序列受体激酶 (leucine-rich repeat sequence receptor-like kinases, LRR-RLKs) 家族成员^[1], 其蛋白结构包含一个由5个富含亮氨酸重复序列 (LRR) 组成的细胞外结构域、一个跨膜结构域和一个细胞内激酶结构域^[2]。SERK 基因最初是从胡萝卜细胞培养物中分离出来的, 并在单细胞胚胎形成中起重要作用^[3]。后来, 陆续在其他的植物中筛选到 SERK 基因家族, 例如, 拟南芥^[4]、水稻^[5]、玉米^[6]、大麦^[7]、小麦^[8]、苹果^[9]等, 表明 SERK 蛋白广泛地分布在植物中, 并在植物的生长、发育及防御反应等方面发挥重要的作用。

目前, SERK 功能的研究主要是利用模式植物拟南芥来开展的。拟南芥中有5个 SERKs 家族成员, 从 *AtSERK1*~*AtSERK5*, 其中在 Col-0 背景下 *AtSERK1*~*AtSERK4* 具有激酶活性并参与了多种生命活动, 而 *AtSERK5* 在 *Ler* 背景下才具有激酶活性^[10]。研究表明, SERK 作为共受体 (Coreceptor), 与不同的受体蛋白一起感受细胞外不同的配体分子, 形成“配体-受体-共受体”的模式, 进而激活相应的细胞信号转导、调控生命活动^[11]。分泌肽 *TPD1* (tapetum determinant 1) 与膜受体 *EMS1* (excess microsporocytes 1) 胞外结构域结合后, *EMS1* 招募 *AtSERK1* 或 *AtSERK2* 形成异源二聚体, 并调控绒毡层细胞发育^[12], 进而调控雄配子体的形成, 而拟南芥 *atserk1*、*atserk2* 双突变表现为雄性不育^[13]。*AtSERK3*, 也称为 *BAK1* (*BR1*-associated receptor kinase 1), 能够在植物激素 *BR* (brassinosteroid, 油菜素类固醇) 与膜受体 *BR1* (brassinosteroid insensitive 1) 结合后快速地被招募形成“*BR*-*BR1*-*SERK3*”复合物, 进而调控 *BR* 介导的植物生长发育^[14]。除了 *AtSERK3* 外, *AtSERK1* 和 *AtSERK4* 也在 *BR* 信号中发挥功能冗余的作用, 拟南芥 *atserk1*、*atserk3*、*atserk4* 三突变体对 *BR* 处理完全不敏感^[15]。

AtSERK3 与 *AtSERK4* 一起, 还介导了植物的免疫反应^[16]。*AtSERK3* 和 *AtSERK4* 能够分别与膜受体 *FLS2* (flagellin-sensing 2)、*EFR* (elongation factor-Tu receptor) 或 *PEPR1/2* (*PEP1* receptor 1/2) 形成异源二聚体, 并分别感受病原性蛋白 *flg22* (一个22个氨基酸残基多肽)、*elf18* (一个18个氨基酸残基多肽) 及植物内源多肽 *Pep1* (peptide 1) 信号分子, 进而起始植物的免疫反应^[17]。拟南芥 *atserk3*、*atserk4* 双突变体持续激活水杨酸依赖的防御途径, 导致活性氧的持续生成及幼苗致死^[18]。拟南芥 *AtSERK1*~*AtSERK4* 冗余地与受体 *HAE* (*HAESA*) 或 *HLS2* (*HAE*-like 2) 结合, 并共同介导分泌多肽 *IDA* (inflorescence deficient in abscission) 调控的花器官脱落, *atserk1*、*atserk2*、*atserk3* 或 *atserk1*、*atserk3*、*atserk4* 三突变体表现出花器官不脱落的表型^[19]。此外, 拟南芥 SERKs 还参与了调控其他生长发育进程, 比如气孔模式 (stomatal patterning) 形成^[20-21]、根的生长^[22]、胁迫响应^[11]等。

在其他植物中, 也证实了 SERKs 在介导植物生长发育及免疫反应过程中的功能保守性。水稻 (*Oryza sativa*) *OsSERK2* 能够与免疫受体 *XA21*、*XA3* 和 *OsFLS2* 互作, 参与对水稻黄单胞菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 抗性的建立^[23-25]。而 *OsSERK1* 和 *OsSERK2* 都能与受体 *OsBR1* 互作, 并介导 *BR* 信号响应^[24-25]。本生烟草 (*Nicotiana benthamiana*) *NbSERK3A* 和 *NbSERK3B* 与 *NbFLS2* 互作, 并感受病原体分子 *INF1*, 进而激活细胞抵御马铃薯晚疫病 (*Phytophthora infestans*) 的侵染^[26-27]。此外, 番茄、棉花、土豆等植物 SERKs 参与免疫响应、配子体发育、*BR* 响应的功能也被发现^[28-29]。

百合是世界上最受欢迎的花卉之一, 其花香浓郁、花朵较大、花色多样^[30]。百合的成熟花药中会释放出大量的油性花粉粒, 这会污染花瓣和衣物, 降低其商品价值, 因此在销售前需要采用人工去雄方法去掉未成熟雄蕊。在规模化生产中, 百合容易受到真菌、细菌及病毒等的侵染, 严重影响产量及品质, 降低其经济价值。因此, 开展百合花粉发育

及抗病分子机制的研究,以便通过分子育种生产无花粉和抗病性强的百合,在生产上具有重要意义^[29]。SERKs 已经被证实参与了植物包括雄配子发育、免疫响应等在内的多种生命活动,目前在百合中并没有相关的报道。本研究从东方百合“西伯利亚”中克隆到了 2 个 SERK 同源基因,分别命名为 *LoSERK1* 和 *LoSERK2*。利用生物信息学方法对 *LoSERKs* 进行了分析,同时采用实时定量 PCR 技术对 SERKs 在不同组织中的表达进行了分析,实验结果可为进一步了解百合中 SERKs 的功能奠定基础。

2 材料与方法

2.1 实验材料

实验材料为东方百合“西伯利亚”种,盆栽于湖南工业大学百合工程研究中心。植物多糖多酚总 RNA 提取试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司,PrimeSTAR GXL DNA 聚合酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司;PCR 产物磁珠回收试剂盒、无缝连接试剂盒和 M-MuLV 逆转录酶购自生工生物工程(上海)股份有限公司。实时荧光定量 PCR 购买自上海罗氏生物公司。

2.2 总 RNA 提取

利用 RNA 试剂盒提取“西伯利亚”总 RNA,然后进行电泳检测(1% 琼脂糖),以总 RNA 为模板,利用 Oligo dT18 引物和 M-MuLV 逆转录酶合成第一链 cDNA,于 -20 ℃ 下保存备用。

2.3 *LoSERKs* 的基因克隆

根据百合转录组测序结果,课题组发现了 2 个 SERK 同源基因序列,这 2 个基因包含有完整的开放阅读框(open reading frame, ORF),长度分别是 1 875 bp 和 1 887 bp,分别命名为 *LoSERK1* 和 *LoSERK2*。利用 Primer Premier 5.0 设计这 2 个基因的特异引物 *LoSERK1-LP/LoSERK1-RP* 和 *LoSERK2-LP/LoSERK2-RP*(见表 1),用于扩增 *LoSERK1* 和 *LoSERK2* 基因 cDNA 序列。以 cDNA 第一链为模板,利用 PrimeSTAR GXL DNA 聚合酶扩增 *LoSERK1* 和 *LoSERK2* 基因 cDNA 序列。PCR 反应体系为 25 mmol/L dNTP Mixture 2.0 μL, GXL buffer 5.0 μL, GXL DNA Polymerase 0.5 μL, Template 0.3 μL, 正向引物 0.7 μL, 反向引物 0.7 μL, ddH₂O 补足至 25.0 μL。扩增程序:95 ℃ 下扩增预变性 2 min;98 ℃ 下扩增 10 s,60 ℃ 下扩增 15 s,68 ℃ 下扩增 2 min,进行 32 个循环;68 ℃ 延伸 5 min,12 ℃ 保存。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,挑取条带大小正确的目的片段送至生工生物工程(上海)股份有限公

司进行双向测序,以确定转录组数据中 *LoSERK1* 和 *LoSERK2* 基因 cDNA 序列的正确性。

表 1 *LoSERKs* 基因的引物序列
Table 1 Primer sequence of *LoSERKs* genes

引 物	序 列
<i>LoSERK1-LP</i>	5'-CCAAATCGACTCTAGAGCTCCCTTCTACTC AATCCTC-3'
<i>LoSERK1-RP</i>	5'-TCGACCCCGGGCCCTGCAGAACAAATCA GCGAACCGACAG-3'
<i>LoSERK2-LP</i>	5'-CCAAATCGACTCTAGAGTTATCCTCCTCGC CAGAAAT-3'
<i>LoSERK2-RP</i>	5'-TCGACCCCGGGCCCTGCAGCTAGTCGTA GCCCTACAAAGAA-3'

2.4 生物信息学分析

利用 DNAMAN 9.0 对 *LoSERK1* 和 *LoSERK2* 基因的 ORF 及其编码氨基酸序列进行分析;利用 NCBI 数据库的 BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对 *LoSERK1* 和 *LoSERK2* 的同源氨基酸序列进行搜索;利用 BioEdit 7.0 对不同物种 SERKs 氨基酸序列进行多重比对,并利用 MEGA 11.0 的邻接法(neighbor joining)构建系统发育进化树;并在线软件 NetPhos 3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk>) 预测磷酸化位点,使用纽普生物(<https://www.novopro.cn/tools/>) 对其进行跨膜结构和信号肽的预测;使用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行三级结构预测。

2.5 *LoSERKs* 的定量分析

提取百合的不同组织,即在西伯利亚百合形成花苞时取其未开的花瓣及未成熟的花药,迅速液氮速冻,保存至 -80 ℃ 冰箱中。而后等到花瓣完全展开后 1 d 取其开放的花瓣和成熟的花药并采取叶片,材料液氮速冻后,保存至 -80 ℃ 冰箱中。后文出现两个不同时间节点不同组织则为此两个时间段材料的总 RNA,使用逆转录酶试剂盒进行百合 First-Strand cDNA 的合成,根据 *LoSERKs* 基因的序列,使用 Primer Premier 6.0 软件设计 qRT-PCR 引物,以百合 β -Actin 基因为内参,引物序列见表 2。

表 2 qRT-PCR 分析的引物序列
Table 2 Primer sequences for qRT-PCR analysis

引 物	序 列
β -Actin2-F	5'-CGGTGTCTGGATTGGAGGGTCA-3'
β -Actin2-R	5'-CTTCCTGTGGACGATGGCTGGA-3'
<i>qSERK1-F</i>	5'-GACGGCTTGC GGATGGTACATTAG-3'
<i>qSERK1-R</i>	5'-AAACCCACGAAGACGGAGAAGATTTC-3'
<i>qSERK2-F</i>	5'-CTCCATCCGAACCTCCACTTGATTG-3'
<i>qSERK2-R</i>	5'-CAGTGATCGTGCAGGTATGATAGCC-3'

将 cDNA 母液稀释 10 倍作为 qRT-PCR 反应体系中的模板,采用 qRT-PCR 的技术检测两个 *LoSERKs* 基因在百合不同组织中的表达量。反应体系为 SYBR Premix Ex Taq II 10.0 μ L,正向引物 1.0 μ L,反向引物 1.0 μ L, cDNA 5.0 μ L, ddH₂O 补足至 20.0 μ L。该反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 下 10 min; 95 $^{\circ}$ C 下 10 s, 60 $^{\circ}$ C 下 15 s, 72 $^{\circ}$ C 下 20 s, 40 个循环后绘制熔解曲线, 95 $^{\circ}$ C 下 10 s, 65 $^{\circ}$ C 下 60 s, 72 $^{\circ}$ C 下 20 s。每个基因做 3 次生物学重复以及技术性重复, 添加以无菌水为模板的空白对照, 按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量。

3 结果与分析

3.1 *LoSERKs* 基因克隆及序列分析结果

基于东方百合西伯利亚的转录组测序数据, 从中筛选出 2 个体细胞胚发生类受体激酶 SERK 的同源基因。以百合叶片的 cDNA 的第一条链为模板, 分别用特异引物对 *LoSERK1*-LP/*LoSERK1*-RP 和 *LoSERK2*-LP/*LoSERK2*-RP 进行 PCR 扩增。获得 *LoSERK1* 和 *LoSERK2* 基因的 cDNA 序列, PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示目标扩增条带 *LoSERK1* 约为 2 200 bp, *LoSERK2* 约为 2 400 bp, 这与预期结果相符 (见图 1, 其中 M 为 DL5000 DNA Maker)。

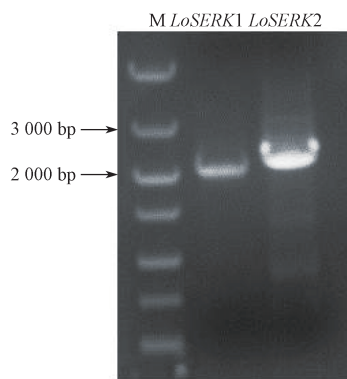


图 1 *LoSERKs* 的 cDNA 序列 PCR 电泳扩增

Fig. 1 PCR electrophoresis amplification of cDNA sequences of *LoSERKs*

测序结果显示, *LoSERK1* 和 *LoSERK2* 基因 cDNA 序列与转录组测序结果一致, 包含完整 ORF 序列, 其中 *LoSERK1* 基因 ORF 全长为 1 875 bp 与编码 624 个氨基酸残基 (见图 2, 其中, 圆圈为磷酸化位点预测), *LoSERK2* 基因 ORF 全长为 1 887 bp, 编码 628 个氨基酸残基 (见图 3, 其中, 圆圈为磷酸化位点预测)。

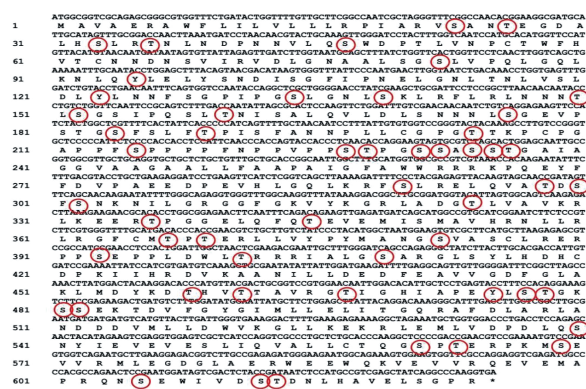


图 2 *LoSERK1* 核苷酸与编码的氨基酸残基序列

Fig. 2 *LoSERK1* nucleotide and encoded amino acid residues sequence

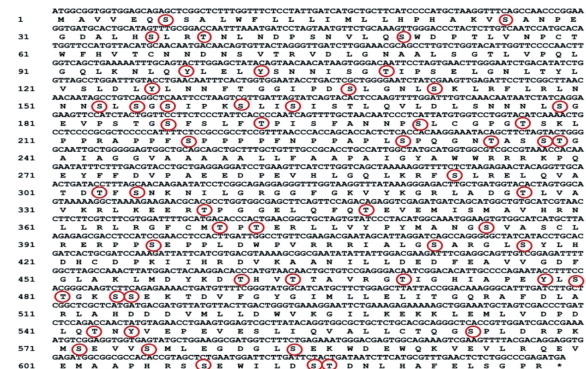


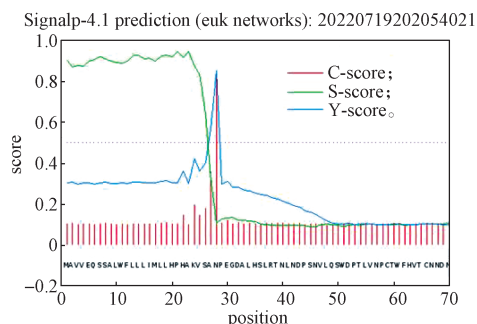
图 3 *LoSERK2* 核苷酸与编码的氨基酸残基序列

Fig. 3 *LoSERK2* nucleotide and encoded amino acid residues sequence

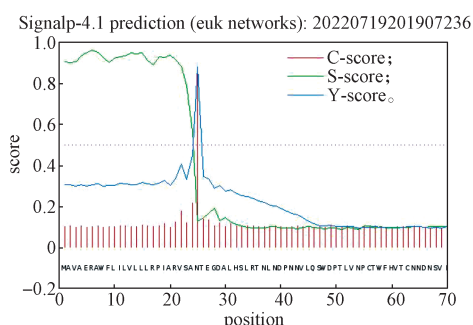
3.2 *LoSERKs* 信号肽、跨膜结构及三级结构预测

使用 DNAMAM9.0 软件分析, *LoSERK1* 蛋白质的相对分子质量为 68 591.0, 平均等电点 (PI) 为 5.35, GC 含量为 48.27%; *LoSERK2* 蛋白质相对分子质量为 68 933.2, 平均等电点 (PI) 为 5.50, GC 含量为 47.38%。通过在线软件由图 4a 和图 6 知 *LoSERK1* 有信号肽的概率为: 99.32%, 信号肽类型为 SP(Sec/SPI); 切割位点: 24~25, 概率为 87.67% 信号肽序列: MAVAERAWFLILVLLLRPIARVSA。由图 4c 可知, *LoSERK1* 含有一个跨膜区, 位点在 242~262。由图 4b 可知, *LoSERK2* 有信号肽的概率为 99.82%, 信号肽类型为 SP(Sec/SPI); 切割位点: 27~28 的概率为 90.90%。信号肽序列为 MAVVEQSSALWFLILLIMLLDPLAKVSA, 由图 4d 可知, *LoSERK2* 含有一个跨膜区, 其位点从 239~261。 *LoSERK1* 有 53 个磷酸化位点 (图 2), *LoSERK2* 有 55 个磷酸化位点 (图 3)。 *LoSERK1* 和 *LoSERK2* 三级结构预测如图 5 所示, 两者以玉米 SERK 为模板, 使用 SWISS-MODEL 进行预测。发现其同源相似性高达 90%。同时也与氨基酸同源序

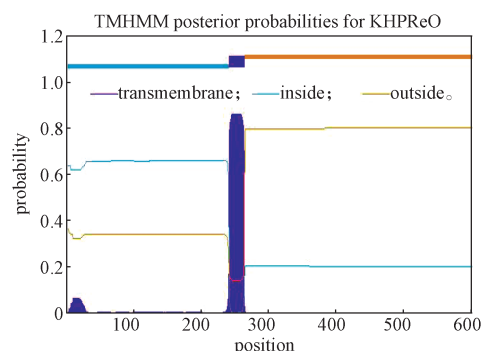
列比对结果相似。表明 SERK 较为稳定, 不易突变, 保守性高。



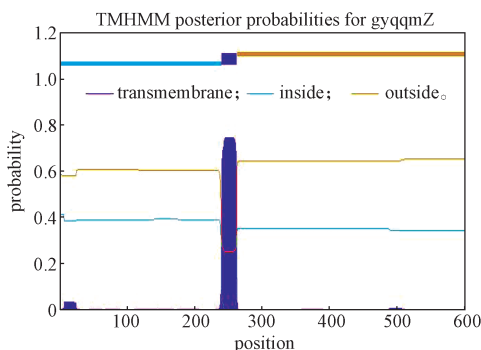
a) *LoSERK1* 信号肽预测



b) *LoSERK2* 信号肽预测



c) *LoSERK1* 跨膜结构预测



d) *LoSERK2* 跨膜结构预测

图4 *LoSERKs* 信号肽及跨膜结构预测结果

Fig. 4 *LoSERKs* signal peptide and transmembrane structure prediction

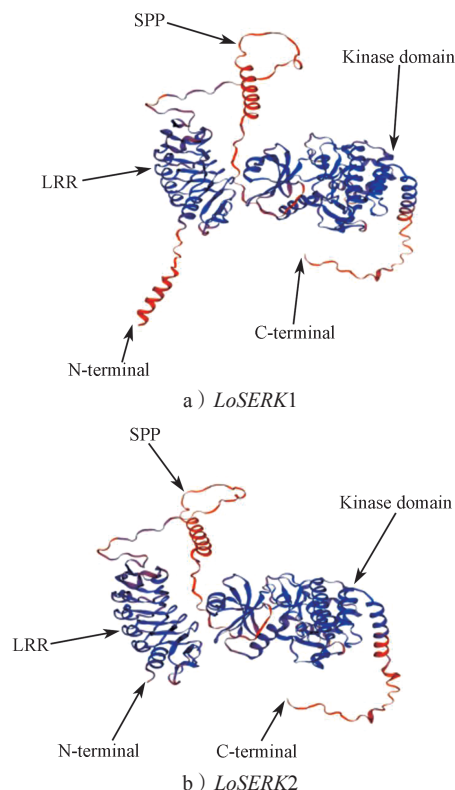


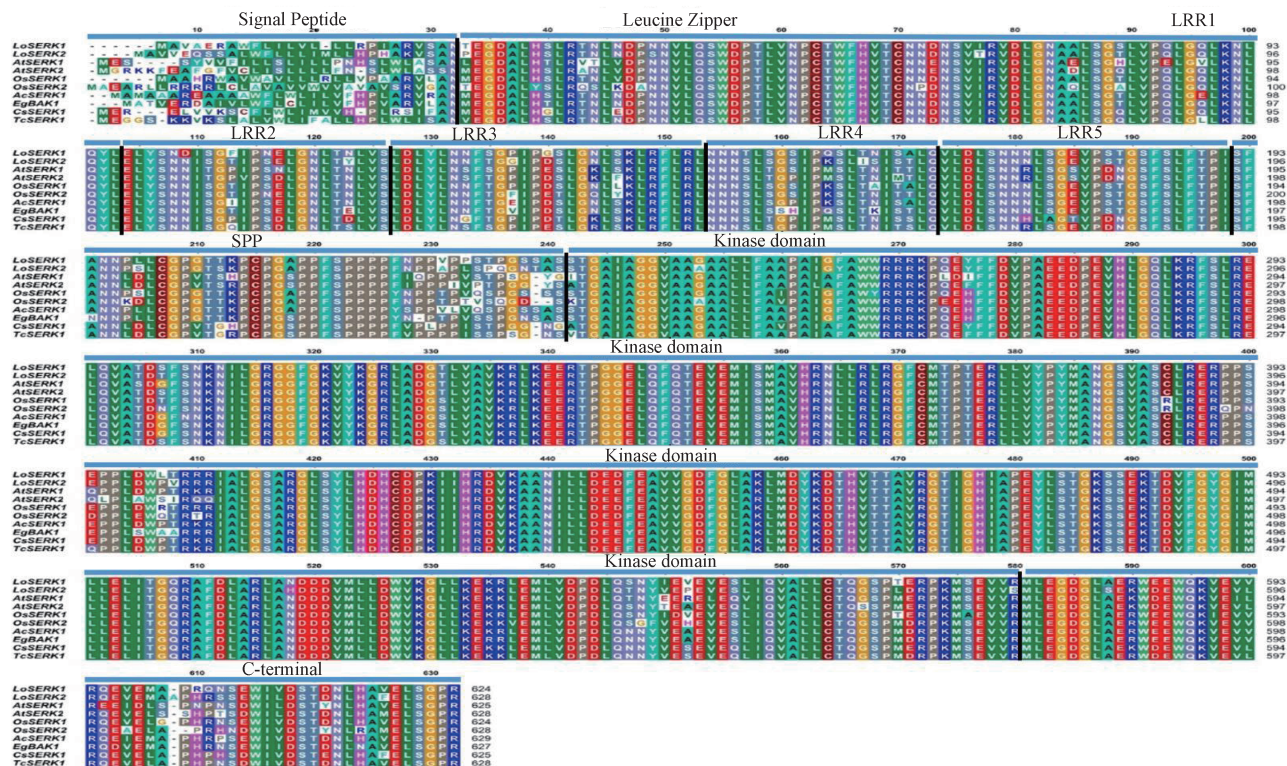
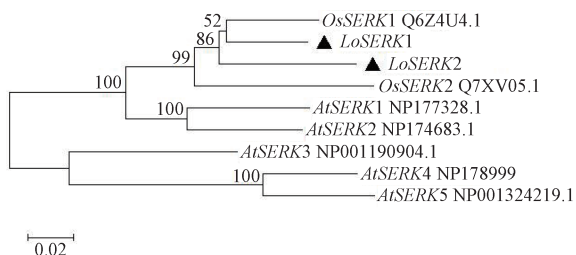
图5 *LoSERKs* 三级结构预测

Fig. 5 *LoSERKs* tertiary structure prediction

3.3 同源性比对分析及系统进化树构建结果

为了研究百合 SERK 的氨基酸序列在进化过程中的保守性及多样性, 将 *LoSERK1* 和 *LoSERK2* 氨基酸序列与其他植物的 SERKs 氨基酸序列进行比对, 包括拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*)、凤梨 (*Ananas comosus*)、油棕 (*Elaeis guineensis*)、茶树 (*Camellia sinensis*)、沉水樟 (*Cinnamomum micranthum*)、可可树 (*Theobroma cacao*)。结果显示, *LoSERK1* 和 *LoSERK2* 的氨基酸序列相似度达到 90.22%, 两者与其他种类的 SERKs 氨基酸序列的相似性也比较高, 与凤梨、油棕等单子叶植物的 SERKs 氨基酸序列相似程度为 92.74~93.21%。与双子叶植物茶树等的相似度也高达 90% (图 6)。

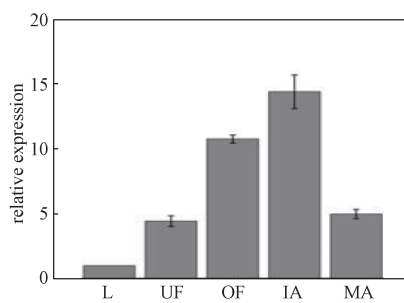
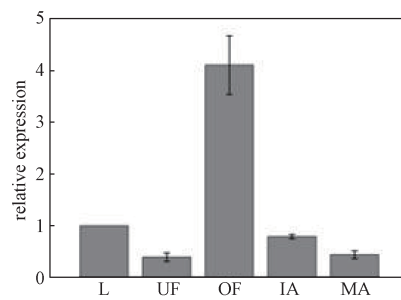
通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure>) 分析发现 *LoSERKs* 有两个超家族成员, 分别为 PLN00113 superfamily、PKc_like superfamily (见图 6)。其中 PLN00113 superfamily 是富含亮氨酸重复序列区域 (LRR), PKc_like superfamily 为激酶结构域。同时基于与拟南芥 *AtSERK1*~*AtSERK5* 和水稻 *OsSERK1*、*OsSERK2* 进行系统进化树构建, 由图 7 可知, *LoSERK1* 与 *LoSERK2* 分别与水稻的 *OsSERK1* 和 *OsSERK2* 相似性较高。

图6 *LoSERKs* 与其他植物 *SERKs* 氨基酸序列多重比对结果Fig. 6 Multiple alignment results of amino acid sequences between *LoSERKs* and *SERKs* of other plants图7 基于拟南芥、水稻及百合 *SERKs* 系统发育树的构建Fig. 7 Construction of *SERKs* phylogenetic tree based on *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* and *Lilium*

3.4 *LoSERKs* 实时定量 PCR 分析

为了研究百合 *SERKs* 在花器官中的表达模式, 以百合叶片中 *LoSERK1*、*LoSERK2* 基因表达量为 1.00, 系统比较两个 *LoSERKs* 基因在叶子、未开放的花瓣、已开放的花瓣、未成熟的花药、已成熟的花药中的相对表达量。结果发现, 两个 *LoSERKs* 基因在不同器官中的表达量存在差异, *LoSERK1* 基因 (图 8a, 其中, L 为叶片; UF 为未开放的花瓣; OF 为开放的花瓣; IA 为未成熟的花药; MA 为已成熟的花药) 在未成熟的花药中的相对表达量最高, 为叶片中的 14.39 倍; 其在已开放的花瓣中表达含量也高达 10.76, 未开放的花瓣和已成熟的花药中相对表达量, 分别为 4.43 和 4.98。 *LoSERK2* 基因 (图 8b) 在已开放的花瓣中的相对表达量 (4.10) 显著高于叶 (1.00)、

未成熟的花药 (0.79)、已成熟的花药 (0.44)、未开放的花瓣 (0.40); 而 *LoSERK2* 基因在未成熟的花药与已开的花药中的相对表达量差异只有 0.35; 该基因在未开的花瓣中的相对表达量最低为 0.40。

a) *LoSERK1*b) *LoSERK2*图8 不同组织中 *LoSERKs* 的相对表达量Fig. 8 Relative expression levels of *LoSERKs* in different tissues

4 讨论

SERK 是植物特有的膜受体激酶, 其以共受体的形式和其他膜受体激酶一起形成异源二聚体, 共同感受外源或内源分子信号, 进而激活酶联受体介导的信号转导途径, 例如 MAPK 信号通路。由于与 SERK 互作的受体激酶及信号分子具有的多样性, 这决定了 SERK 激酶参与多元化的生物学功能, 如激素信号转导、免疫反应^[17]、雄配子体发育^[13]、花器官脱落等多方面的生理功能^[19]。SERK 在植物中广泛存在, 且其介导的信号调控模式在不同植物间具有相对保守性。例如, 介导激素 BR (*BR-BRI1-SERKs*)^[14] 和病原菌诱导的免疫响应 (*flg22-FLS-SERKs*) 信号模式被证实存在于拟南芥、水稻和番茄中^[11], 而调控花器官脱落的“*IDA1-HAE/HSL2-SERKs*”信号模式保守地存在于拟南芥和烟草中^[19-20]。通过对模式植物中 SERK 相关功能的研究, 为其他植物中开展 SERK 功能研究提供了重要参考。

本文基于百合转录组测序数据, 克隆了 2 个东方百合 SERK 同源基因 *LoSERK1* 和 *LoSERK2*, 分别编码 624 和 628 个氨基酸, 两者氨基酸序列相似性非常高, 达 90.22%。*LoSERK1* 和 *LoSERK2* 氨基酸序列与其他植物氨基酸序列相似性很高, 例如与 *AtSERK1*、*AtSERK2*、*OsSERK1*、*OsSERK2* 的序列相似性均高于 90.28%。同时 *LoSERK1* 和 *LoSERK2* 氨基酸序列长度与其他植物中 SERKs 氨基酸长度很接近, 例如拟南芥 *AtSERK1* (625)、*AtSERK2* (628)、*OsSERK1* (624)、*OsSERK2* (628)。通过生物信息学分析, 发现蛋白具有信号肽, 且预测到跨膜结构域, 推测这两个蛋白为细胞质膜定位蛋白^[21]。在其三级结构中, *LoSERK1* 和 *LoSERK2* 均以玉米 *ZmSERK1* 为模板进行三级结构预测, 其相似程度都为 90% 以上。此外, *LoSERK1* 和 *LoSERK2* 的氨基酸序列中都具有 5 个典型的 LRR 结构域和胞内的激酶结构域, 这表明了 SERK 在生物进化过程中的保守性。系统进化树研究也表明, *LoSERK1* 和 *LoSERK2* 与双子叶拟南芥 *AtSERK1* 和 *AtSERK2* 分为一支, 与水稻中的 *OsSERK1* 和 *OsSERK2* 相似, 这表明单子叶植物中可能并不存在与双子叶拟南芥 *AtSERK3* 和 *AtSERK4* 亲缘性很近的 SERK。单子叶植物中的 SERK 数量可能要少于双子叶植物, 例如水稻、玉米和百合中发现 2 个 SERKs, 而拟南芥有 5 个^[31]、苜蓿有 6 个^[32]、苹果有 12 个^[3]、大豆有 25 个^[12]。SERK 受体与其他不同的受体 (如 *BRI1*、*EMS1*、*FLS*、*HAE*) 一起感

受不同的细胞外信号分子, 进而引起受体胞内激酶结构域的磷酸化及转磷酸化, 通过改变受体的激酶活性, 从而激活细胞内的信号转导^[9]。在进行百合 *LoSERK1* 和 *LoSERK2* 氨基酸序列分析时, 也发现了这两个蛋白质的激酶结构域分别有 28 个和 29 个潜在磷酸化位点, 这些磷酸化位点可能与胞质激酶活性有关^[22]。

百合观赏性强, 但其生产中也面临一些问题, 例如, 百合花粉量大且容易污染花瓣及衣物、百合花瓣过早脱落、百合种植过程中容易染病等, 这些都会影响其产业发展。在拟南芥中 *AtTPD1* 能够被定位在绒毡层前体细胞和绒毡层细胞质膜上的受体激酶 *AtEMS1* 的胞外区所感知, 并快速招募 *AtSERK1* 或 *AtSERK2*, 进而引起受体间相互磷酸化, 将信号传递到下游, 最终决定花药绒毡层的命运及雄配子体的发育^[32], 拟南芥 *atserk1*、*atserk2* 双突变会导致雄配子败育^[13]。棉花中 *GhSERK1* 也被发现能控制花粉发育, RNAi 干扰 *GhSERK1* 基因的表达会导致雄性不育的表型^[11]。对不同时期百合花药的表达分析表明, *LoSERK1* 在未成熟和成熟花药中的相对表达量均高于叶片中, 其中未成熟花药 (14 倍) 和成熟花药 (5 倍), 而 *LoSERK2* 在花药中的相对表达量略低于叶片中, 这暗示 *LoSERK1* 在雄配子体形成过程中的重要性可能更大。之前研究表明, *AtHAE* 及其同源基因 *AtHSL2* 在花器官分离时期的离层区细胞中表达^[21-22], *AtSERK1~AtSERK4* 基因也在花器官离层区细胞中有表达^[24], 分泌型小肽 *AtIDA* 能被受体激酶 *AtHAE* 和 *AtHSL2* 的胞外区感知^[27], *AtHAE/AtHSL2* 和共受体 *AtSERKs* 形成异源二聚体, 通过磷酸化作用激活下游 *MKK4/MKK5-MPK3/MPK6*, 进而通过调控细胞壁重塑酶基因的表达来调控花器官脱落^[24, 27]。拟南芥 *AtSERK1~AtSERK4* 冗余地参与花器官脱落调控, 其中 *AtSERK1* 发挥最重要的功能, *atserk1*、*atserk2*、*atserk3* 或 *atserk1*、*atserk3*、*atserk4* 三重突变体都会导致花器官不脱落^[17]。两个百合 *LoSERKs* 均在已经完全开放的花瓣中表达量显著高于未开放花瓣和叶片, 由此推测, *LoSERK1* 和 *LoSERK2* 可能会与花器官脱落有关, 但还需要进一步证实。根据系统进化树的分析结果, 百合与水稻的 SERKs 亲缘性更近, 预示着 *LoSERKs* 有在免疫反应及激素 BR 响应的功能。未来, 利用基因编辑或者 RNA 沉默的方法将这两个百合 SERKs 基因进行干扰、敲除或突变, 可能会获得无花粉的百合, 或者抗病性改变、花器官不脱落、植株生长改变等新表型的百合材料。

5 结语

本文基于转录组测序结果, 对百合体细胞胚发生类受体激酶同源基因 *LoSERK1* 和 *LoSERK2* 进行了克隆, 并通过生物信息学预测其功能, 实时定量分析其在花器官中的表达情况。结果表明, 百合 *LoSERK1* 和 *LoSERK2* 分别编码 624 和 628 个氨基酸, 且两个百合 SERKs 在进化过程中具有高度的保守性, 主要体现为蛋白质胞外 LRR 重复单元和胞内激酶结构域的保守性。百合与水稻的 SERKs 之间亲缘关系很近, 暗示百合 SERKs 可能参与激素 BR 和免疫响应。百合 *LoSERK1* 基因在花药成熟过程的表达量很高, 预示 *LoSERK1* 基因在雄配子形成中发挥功能。*LoSERK1* 和 *LoSERK2* 基因在成熟花瓣中的表达量都很高, 推测两个 *LoSERKs* 基因可能参与了花器官的脱落。本研究可为进一步开展百合 SERKs 功能研究及育种应用创造条件。

参考文献:

- [1] SHIU S H, BLEECKER A B. Receptor-Like Kinases from *Arabidopsis* Form a Monophyletic Gene Family Related to Animal Receptor Kinases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(19): 10763-10768.
- [2] FAN M, WANG M M, BAI M Y. Diverse Roles of SERK Family Genes in Plant Growth, Development and Defense Response[J]. Science China Life Sciences, 2016, 59(9): 889-896.
- [3] ZHENG L W, MA J J, MAO J P, et al. Genome-Wide Identification of SERK Genes in Apple and Analyses of Their Role in Stress Responses and Growth[J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 1-18.
- [4] 李会强. SERKs 调控拟南芥胚胎维管前体和基本组织干细胞的分裂 [D]. 兰州: 兰州大学, 2019.
LI Huiqiang. SERKs Regulates the Division of Vascular Precursors and Basic Tissue Stem Cells in *Arabidopsis* Embryos[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2019.
- [5] 张福臻, 刘方惠, 陈鑫欣, 等. 水稻 *OsRPK2* 基因的克隆及功能初步鉴定 [J]. 植物研究, 2021, 41(4): 604-613.
ZHANG Fuzhen, LIU Fanghui, CHEN Xinxin, et al. Cloning and Functional Analysis of Rice Gene *OsRPK2*[J]. Bulletin of Botanical Research, 2021, 41(4): 604-613.
- [6] 牛筱. 玉米体细胞胚胎发生相关基因 *ZmSERK* 的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2014.
NIU Xiao. Study on *ZmSERK*, a Gene Related to Somatic Embryogenesis in Maize[D]. Changchun: Jilin University, 2014.
- [7] 杨沙沙, 李颖波, 谭何新, 等. 大麦 *SERK* 基因家族 cDNA 克隆及生物信息学分析 [J]. 上海农业学报, 2016, 32(3): 5-13.
YANG Shasha, LI Yingbo, TAN Hexin, et al. Cloning and Bioinformatics Analysis of *SERK* Gene Family in Barley(*Hordeum Vulgare* L.)[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2016, 32(3): 5-13.
- [8] SINGH A, KHURANA P. Ectopic Expression of Triticum Aestivum *SERK* Genes (*TaSERKs*) Control Plant Growth and Development in *Arabidopsis*[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 12368.
- [9] GHAI D, ALOK A, UPADHYAY S K, et al. Genome Wide Characterization of the SERK/SERL Gene Family in *Phalaenopsis Equestris*, *Dendrobium Catenatum* and *Apostasia Shenzhenica* (Orchidaceae)[J]. Computational Biology and Chemistry, 2020, 85: 107210.
- [10] WU W Z, WU Y J, GAO Y, et al. Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase 5 in the Ecotype *Landsberg Erecta* of *Arabidopsis* is a Functional RD LRR-RLK in Regulating Brassinosteroid Signaling and Cell Death Control[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 852.
- [11] MA X Y, XU G Y, HE P, et al. SERKing Coreceptors for Receptors[J]. Trends in Plant Science, 2016, 21(12): 1017-1033.
- [12] JIA G X, LIU X D, OWEN H A, et al. Signaling of Cell Fate Determination by the TPD1 Small Protein and EMS1 Receptor Kinase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(6): 2220-2225.
- [13] ALBRECHT C, RUSSINOVA E, HECHT V, et al. The *Arabidopsis Thaliana* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1 and 2 Control Male Sporogenesis[J]. The Plant Cell, 2005, 17(12): 3337-3349.
- [14] WANG X F, KOTA U, HE K, et al. Sequential Transphosphorylation of the BRI1/BAK1 Receptor Kinase Complex Impacts Early Events in Brassinosteroid Signaling[J]. Developmental Cell, 2008, 15(2): 220-235.
- [15] GOU X P, YIN H J, HE K, et al. Genetic Evidence for an Indispensable Role of Somatic Embryogenesis Receptor Kinases in Brassinosteroid Signaling[J]. PLoS Genetics, 2012, 8(1): e1002452.
- [16] LU D P, WU S J, GAO X Q, et al. A Receptor-Like Cytoplasmic Kinase, BIK1, Associates with a Flagellin Receptor Complex to Initiate Plant Innate Immunity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(1): 496-501.

- [17] SHI H, SHEN Q J, QI Y P, et al. BR-SIGNALING KINASE1 Physically Associates with FLAGELLIN SENSING2 and Regulates Plant Innate Immunity in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(3): 1143–1157.
- [18] HE K, GOU X P, YUAN T, et al. BAK1 and BKK1 Regulate Brassinosteroid-Dependent Growth and Brassinosteroid-Independent Cell-Death Pathways[J]. *Current Biology*, 2007, 17(13): 1109–1115.
- [19] MENG X Z, ZHOU J G, TANG J, et al. Ligand-Induced Receptor-Like Kinase Complex Regulates Floral Organ Abcission in *Arabidopsis*[J]. *Cell Reports*, 2016, 14(6): 1330–1338.
- [20] MENG X Z, CHEN X, MANG H, et al. Differential Function of *Arabidopsis* SERK Family Receptor-Like Kinases in Stomatal Patterning[J]. *Current Biology*, 2015, 25(18): 2361–2372.
- [21] KIM T W, MICHNIEWICZ M, BERGMANN D C, et al. Brassinosteroid Regulates Stomatal Development by GSK3-Mediated Inhibition of a MAPK Pathway[J]. *Nature*, 2012, 482: 419–422.
- [22] DU J B, YIN H J, ZHANG S S, et al. Somatic Embryogenesis Receptor Kinases Control Root Development Mainly via Brassinosteroid-Independent Actions in *Arabidopsis Thaliana*[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2012, 54(6): 388–399.
- [23] CHEN X W, ZUO S M, SCHWESSINGER B, et al. An XA21-Associated Kinase (*OsSERK2*) Regulates Immunity Mediated by the XA21 and XA3 Immune Receptors[J]. *Molecular Plant*, 2014, 7(5): 874–892.
- [24] LI D, WANG L, WANG M, et al. Engineering *OsBAK1* Gene as a Molecular Tool to Improve Rice Architecture for High Yield[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2009, 7(8): 791–806.
- [25] PARK H S, RYU H Y, KIM B H, et al. A Subset of *OsSERK* Genes, Including *OsBAK1*, Affects Normal Growth and Leaf Development of Rice[J]. *Molecules and Cells*, 2011, 32(6): 561–569.
- [26] CHAPARRO-GARCIA A, WILKINSON R C, GIMENEZ-IBANEZ S, et al. The Receptor-Like Kinase SERK3/BAK1 is Required for Basal Resistance Against the Late Blight Pathogen *Phytophthora Infestans* in *Nicotiana Benthamiana*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16608.
- [27] DU J, VERZAUX E, CHAPARRO-GARCIA A, et al. Elicitin Recognition Confers Enhanced Resistance to *Phytophthora Infestans* in Potato[J]. *Nature Plants*, 2015, 1: 15034.
- [28] HOLTON N, NEKRASOV V, RONALD P C, et al. The Phylogenetically-Related Pattern Recognition Receptors EFR and XA21 Recruit Similar Immune Signaling Components in Monocots and Dicots[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(1): e1004602.
- [29] LACOMBE S, ROUGON-CARDOSO A, SHERWOOD E, et al. Interfamily Transfer of a Plant Pattern-Recognition Receptor Confers Broad-Spectrum Bacterial Resistance[J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(4): 365–369.
- [30] GONG B H, YI J, WU J, et al. LIHSFA1, a Novel Heat Stress Transcription Factor in Lily (*Lilium Longiflorum*), can Interact with LIHSFA2 and Enhance the Thermotolerance of Transgenic *Arabidopsis Thaliana*[J]. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(9): 1519–1533.
- [31] 何福林, 刘 询, 张 斌. 大豆 SERK 基因家族生物信息学及盐胁迫下的表达分析 [J]. *西北农业学报*, 2019, 28(10): 1708–1717.
- HE Fulin, LIU Xun, ZHANG Bin. Bioinformatics Identification of SERK Genes and Expression Analysis Under Salt Stress in Soybean[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2019, 28(10): 1708–1717.
- [32] GAO X Q, LI F J, LI M Y, et al. Cotton GhBAK1 Mediates *Verticillium* Wilt Resistance and Cell Death[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2013, 55(7): 586–596.

(责任编辑: 申 剑)