

文章编号:1001-1498(2013)06-0673-08

# 日本落叶松体细胞胚胎发生相关基因 *LaSERK1* 的克隆与表达分析

李 龙<sup>1</sup>, 张立峰<sup>2</sup>, 齐力旺<sup>2</sup>, 韩素英<sup>1\*</sup>

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所,北京 100091;  
2. 中国林业科学研究院林业研究所细胞生物学实验室,北京 100091)

**摘要:**本研究克隆了日本落叶松体细胞胚胎发生相关受体类蛋白激酶基因 *LaSERK1*,并检测了在不同培养条件下 *LaSERK1* 的表达情况,发现 *LaSERK1* 与已发现的其他物种 *SERK1* 基因有高度相似性,qRT-PCR 结果显示:*LaSERK1* 在体胚发生早期高表达。结果表明:*LaSERK1* 可能在落叶松体胚发育早期起重要作用,*LaSERK1* 也可能成为早期胚性细胞的标记基因。

**关键词:**日本落叶松;体细胞胚胎发生;*SERK1*;表达分析

中图分类号:S718.46

文献标识码:A

## Characterization and Expression of the Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase 1 (*SERK1*) Gene During Somatic Embryogenesis of *Larix kaempferi*

LI Long<sup>1</sup>, ZHANG Li-feng<sup>2</sup>, QI Li-wang<sup>2</sup>, HAN Su-ying<sup>1</sup>

(1. Research institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China;  
2. Laboratory of Cell Biology, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

**Abstract:** Somatic embryogenesis not only plays a significant role in understanding the mechanism of embryogenesis, but also in improving the breeding of *Larix kaempferi* (Lamb.) Carr. The somatic embryogenesis receptor-like kinase 1 (*SERK1*) gene is considered as an essential element involved in the early stage of this process. The expression pattern of the homolog of *SERK1* of *L. kaempferi* in different culture conditions was studied. *LaSERK1* shared all the characteristic domains of the *SERK* family. The qRT-PCR showed that *LaSERK1* was highly expressed in *L. kaempferi* early embryogenic cells cultured in the mature medium. These results suggest that *LaSERK1* might perform a significant role during early somatic embryogenesis of *L. kaempferi*, and might be a potential marker of early embryogenic cells.

**Key words:** *Larix kaempferi*; somatic embryogenesis; *SERK1*; expression pattern

落叶松(*Larix* spp.)是我国北方、日本及欧洲重要的速生造林树种,但其扦插繁育较难,繁殖周期较长,不适合使用传统繁殖手段进行扩繁<sup>[1]</sup>。植物体细胞胚胎发生是落叶松无性快速繁殖的重要途径,

因为体细胞胚胎发生途径与合子胚的发生途径在各发育时期形态变化和生物化学成分变化类似<sup>[2]</sup>,因此,成为研究胚胎发育机理的优良模式系统。体细胞胚胎发生也成为研究落叶松胚胎发育过程及遗传

收稿日期:2013-04-16

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973)项目“速生优质林木培育的遗传基础及分子调控”(2009CB119100);国家高技术研究发展计划(863)项目“高产优质多抗林木花草分子与细胞高效育种技术及品种创制”(2006AA100109)

作者简介:李 龙(1988—),男,山东德州人,在读硕士研究生,从事树木生物技术研究。

\* 通讯作者:教授,硕士生导师。主要研究方向:树木生物技术。E-mail:syhan@caf.ac.cn

转化的模式体系。目前,已经验证出很多体细胞胚胎发生相关基因,如体细胞胚胎发生相关受体类蛋白激酶 *SERK1*<sup>[3]</sup>、*LEAFY COTYLEDON1* (*LEC1*)<sup>[4]</sup>、*CLAVATA* 家族<sup>[5]</sup>、*WUSCHEL* (*WUS*)<sup>[6]</sup>、晚期胚胎丰富蛋白<sup>[7]</sup>、细胞分裂相关基因 *CYCLIN D3* (*CYCD3*)<sup>[8]</sup> 和阿拉伯半乳糖蛋白 (*AGP*)<sup>[9]</sup> 等,它们都在体胚发育过程中有着特异表达,暗示这些基因可能在体胚发生调控过程中发挥重要作用。

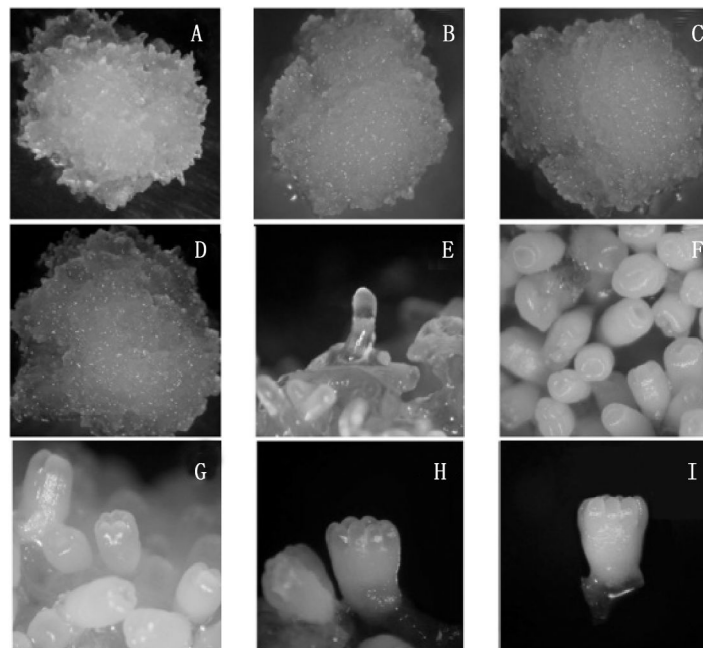
体细胞胚胎发生相关受体类蛋白激酶 *SERK1* 最先在胡萝卜中分离出来,*SERK1* 属于膜富含氨基酸重复序列类受体蛋白激酶 (*LRR-RLKs*) 家族的一员。*LRR-RLKs* 是跨膜蛋白,在动植物中广泛存在,其蛋白结构分为胞外受体结构域、跨膜结构域和胞内激酶结构域,在多种生命活动如胞外信号跨膜传导、植物胁迫响应和发育调控等方面发挥重要作用<sup>[10-11]</sup>。*SERK1* 基因首先在胡萝卜 (*DcSERK1*) 胚性细胞中分离到,它只在胚性细胞中表达且只表达达到体细胞胚的球形期,表明 *DcSERK1* 可以作为体细胞胚发生早期或胚性细胞的标记基因<sup>[3]</sup>。之后研究人员在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)<sup>[12]</sup>、玉米 (*Zea mays* L.)<sup>[13]</sup>、水稻 (*Oryza sativa* L.)<sup>[14]</sup>、番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.)<sup>[15]</sup>、马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.)<sup>[15]</sup>、可可 (*Theobroma cacao* L.)<sup>[16]</sup>、向日葵 (*Helianthus annuus* L.)<sup>[17]</sup>、紫花苜蓿 (*Medica-*

*go sativa* L.)<sup>[18]</sup> 等植物中分离到不同的 *SERK1* 基因。裸子植物中也存在 *SERK1* 基因,南京林业大学高燕等<sup>[19]</sup> 分离得到马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb.) *PmSERK1* 基因,Steiner 等<sup>[20]</sup> 克隆了南洋杉 (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze) *AaSERK1* 基因,说明 *SERK1* 基因广泛存在于被子植物及裸子植物中。本研究以日本落叶松 (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carr.) 为研究对象,以本实验室长期继代保存的已建立高效稳定体细胞胚胎发生体系的优良日本落叶松杂种无性系胚性愈伤组织 d202 为材料,在转录组测序的基础上,克隆落叶松 *SERK1* 全长 cDNA,利用 qRT-PCR 研究其在不同培养基和不同发育时期的表达情况,为进一步深入研究落叶松体胚发生过程中 *SERK1* 功能提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

本实验采用日本落叶松胚性细胞系 d202 为实验材料,包括无激素的基本培养基 (MD0) 培养的细胞团 (E7 d),继代培养基 (MD1) 培养的原胚团时期 (E14 d),ABA 诱导 (MD2) 的早期单胚 (1~3 d)、中期单胚 (7~14 d)、晚期单胚 (21 d)、早期子叶胚 (28 d)、中期子叶胚 (35 d) 和晚期子叶胚 (42 d) 的体细胞胚培养物 (图 1)。用镊子分别夹取不同时期



A: MD0 培养基上的愈伤组织;B: MD1 培养基上的原胚团;C: MD2 培养基上的早期单胚时期细胞团;D: 7 d 中期单胚时期细胞团;E: 14 d 中期单胚;F: 21 d 晚期单胚;G: 28 d 早期子叶胚细胞团;H: 35 d 中期子叶胚;I: 42 d 晚期子叶胚。A、B、C、D(1×1),E、F、G、H、I(1×10)。

图 1 落叶松体胚发生不同时期体细胞胚培养物

细胞团上层的新鲜细胞组织,迅速投入液氮冷冻,再将冷冻后的细胞小块置于冷冻管中,于  $-80^{\circ}\text{C}$  贮存备用。无激素基本培养基包含基本的 BM 盐和维生素,但没有任何激素。继代培养基(含 2,4-D 和 BA)与成熟培养基(含 ABA)配方使用齐力旺等<sup>[21]</sup>利用 311-A 最优回归设计获得的最佳培养基方案。

## 1.2 试剂

限制性内切酶和 T4 连接酶均购自英国新英格兰实验室(New England Lab)公司;qRT-PCR 定量试剂盒、Takara RNAisoTM Plus、MiniBEST 小量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自大连宝生物公司;IPTG、X-gal 等化学药品购自上海生工;克隆载体 pEASY-T1 cloning vector、感受态细胞 Trans1-T1 Phage Resistant Chemically 购自全式金生物科技有限公司;DNA Marker 购自天根生物科技有限公司。RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒购自 Thermo Scientific 公司;Pfu 购自 Promega 公司,SMARTer RACE kit 购自 Clontech。

## 1.3 方法

1.3.1 落叶松总 RNA 提取 各时期细胞总 RNA 提取参照大连宝生物公司 Takara RNAisoTM Plus 试剂盒说明书进行。总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶检测质量,同时用 Nanodrop1000 测定  $OD_{260}/OD_{280}$  值,检测纯度和浓度,并计算含量。

1.3.2 cDNA 第 1 条链合成 参照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书获得落叶松体胚发育各时期细胞 cDNA 第 1 条链。

1.3.3 *LaSERK1* 的克隆 原始序列来自本课题组在日本落叶松 O638 细胞系原胚团转录组测序中得到的 contig 片段 PEMC22526 (Genbank accession: JR151620),该片段在 NCBI 网站 BLAST 得到的结果显示其与其他物种 *SERK1* 序列有很高的相似性,且该片段位于 *SERK1* 基因 3' 端,包含终止密码子。根据本段序列设计扩增 *SERK1* 基因 5' RACE 引物:5'-GAAGTGCTCCTGTGGCTTTCGGCG-3', RACE 步骤按照 clontech SMARTer RACE kit 说明书中的 Program2 进行,得到的片段连接到 pEASY-T1 上进行克隆测序。

1.3.4 *LaSERK1* 编码序列 CDS 全长获得 使用序列拼接软件 ContigExpress 将 5' RACE 测序所得结果与转录组中 PEMC22526 (Genbank accession: JR151620) 片段进行拼接获得 *LaSERK1* 编码序列 CDS 全长。

## 1.4 *LaSERK1* 进化树构建

使用 MEGA 的 Alignment 功能对 *LaSERK1* 和其它物种 *SERK1* 进行多序列比对,使用 MEGA 的 neighbor-joining analysis 功能进行系统进化树构建分析,相关参数使用其默认值。

## 1.5 *LaSERK1* 蛋白结构性质预测

使用 DOG 1.0 绘出 *LaSERK1* 蛋白一级结构<sup>[22]</sup>,用 Swiss-model 网站 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 提供的在线自动预测功能预测 *LaSERK1* 蛋白高级结构并与其它物种蛋白结构进行比对<sup>[23-25]</sup>。

## 1.6 *LaSERK1* 基因的表达模式

各时期细胞总 RNA 提取参照大连宝生物公司 Takara RNAisoTM Plus 试剂盒说明书进行。使用 RQ1 RNase-Free Dnase (Promega, 上海) 去除基因组 DNA 用 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, EU) 反转录,cDNA 稀释 5 倍于 ABI7500 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 上进行定量分析。用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计 *LaSERK1* 定量引物:

*LaSERKF*: 5'-GCAACAATGATAACAGTGGATA-AGA-3';

*LaSERKR*: 5'-GTAGGCCAAGCTGGGGAA-3'。

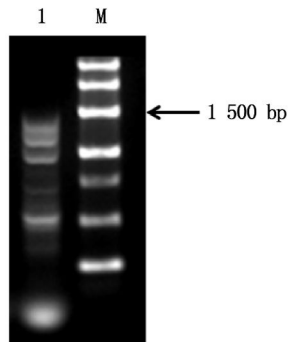
使用 *EF-1a* 作为内参基因<sup>[26]</sup>,设计引物如下:  
*LaEF-17*: 5'-GACTGTACCTGTTGGTCGTG-3';  
*LaEF-18*: 5'-CCTCCAGCAGAGCTTCAT-3'。反应体系采用大连宝生物 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 说明书中 20  $\mu\text{L}$  体系加样,采用 2 步法 PCR 扩增标准程序,阶段 1:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s;阶段 2:95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  34 s,40 个循环;最后进行熔解曲线分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *LaSERK1* 5' RACE 结果

进行 5' RACE 后 1.0% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 2。切取最上面一条带测序,得到 5' 片段 1 215 bp。将得到的片段在 NCBI 的 BLASTn 中比对,与其他物种 *SERK1* 有很高的相似性;使用序列拼接软件 ContigExpress 将此片段与转录组中的 PEMC22526 进行拼接,发现该片段 3' 端与 PEMC22526 的 5' 端有重叠,说明此片段为目的片段。由图 2 还可看出:紧靠第 1 条带的下面还有 2 条带,经测序得知它们是和最上面一条带的 3' 端相同的片段,但它们的 5' 端有不同长度缺失,可能是 RNA 提取过程中 *SERK1* mRNA 5' 端

发生了部分降解导致 RACE 结果大小不一。



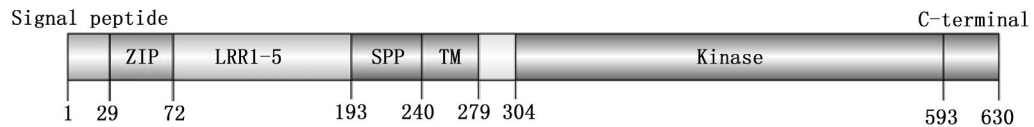
M:100 bp DNA Marker; 1:5' RACE 条带  
图2 5' RACE 后 1.0% 琼脂糖凝胶电泳结果

## 2.2 *LaSERK1* 编码序列全长获得

使用序列拼接软件 ContigExpress 将此片段与转录组中的 PEMC22526 进行拼接,得到 2 627 bp 长的序列片段,使用 NCBI 中的 ORFinder 分析发现:这段序列包括 5' 非编码序列 343 bp、编码序列全长 CDS 1 893 bp(含终止密码子)以及 3' 非编码序列 391 bp。命名为 *LaSERK1* (Genbank accession: KC915037),其编码序列共编码 630 个氨基酸。

## 2.3 *LaSERK1* 蛋白一级结构

DOG 1.0 绘出的 *LaSERK1* 蛋白一级结构见图 3。

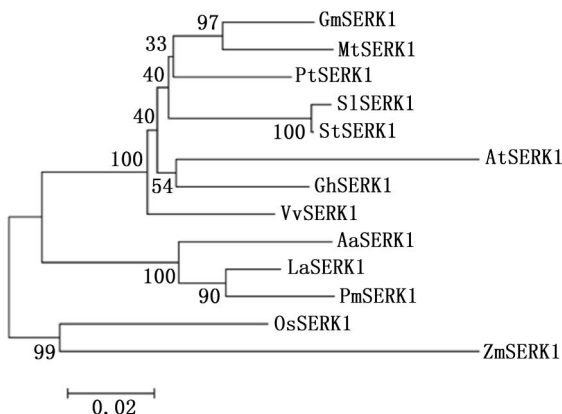


Signal peptide: 信号肽; ZIP:亮氨酸拉链(leu zipper); LRR: 富亮氨酸重复序列(Leu-rich repeat); SPP: 含 SPP(Ser Pro—Pro) 基序的富脯氨酸结构域; TM: 跨膜结构域(trans-membrane region); Kinase: 激酶结构域; C-terminal: C 末端

图3 *LaSERK1* 蛋白一级结构

## 2.4 *LaSERK1* 的进化树构建及相似性比对

2.4.1 *LaSERK1* 的进化树构建 使用 MEGA 的 neighbor-joining analysis 功能进行进化树构建分析(图 4)。由图 4 可以看出:落叶松 *LaSERK1* 与南洋杉和马尾松 *PmSERK1* 进化关系最近。



Gm: 大豆(*Glycine max* L.); Mt: 紫花苜蓿; Pt: 毛果杨(*Populus trichocarpa* Torr. & Gray); Sl: 番茄; St: 马铃薯; At: 拟南芥; Gh: 陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.); Vv: 葡萄(*Vitis vinifera* L.); Aa: 南洋杉; La: 日本落叶松 Os: 梗稻(*Oryza sativa* subsp. *japonica* Kato); Pm: 马尾松; Zm: 玉米

图4 *LaSERK1* 的系统进化树

## 2.4.2 SERK1 蛋白一级结构序列比对 使用 MEGA

的 Alignment 功能对 13 个物种的 SERK1 蛋白一级结构序列进行比对,由图 5 可见:落叶松 *LaSERK1* 与马尾松 *PmSERK1* 和南洋杉 *AaSERK1* 全长编码序列的相似性都达到了 93%。保守性最高的是激酶结构域,其在上述 13 个物种中的相似性高达 93% 以上,保守性最差的是信号肽。

2.4.3 SERK1 蛋白高级结构序列比对 用 Swiss-model 网站 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 提供的在线自动预测功能预测 *LaSERK1* 蛋白高级结构并与其它物种的蛋白结构进行比对(图 6)。由图 6 可以看出:Swiss-model 自动预测的 13 个物种的 SERK1 蛋白 ZIP-LRR-SPP(胞外)结构域和激酶(胞内)结构域 2 部分高级结构相似性都很高。

## 2.5 *LaSERK1* 基因在不同培养基中的表达模式

落叶松 d202 细胞系各时期的细胞定量分析结果见图 7。由图 7 可看出:在 MD2(1~3 d)中 *LaSERK1* 的表达上调明显,第 2 天时最高。第 7 天时表达量已经下降,7 d 之后的各时期表达量基本呈递减趋势。说明不同培养条件下,激素等物质会明显影响 *LaSERK1* 基因在细胞中的表达。

LaSERK1	...MQQFYVVLALL...WLLLLHHFLNRVFA...TEGDALHSRLSNLIDFNPNVLQSWDPTLVNCTWFHVICNNDNSVIRVDLGNALSGSLVFLGQLNN	93			
AaSERK1	...MRGAVLGDMAV...LLLLLLAGVGCNTEGDALHSRLSNLIDFNPNVLQSWDPTLVNCTWFHVICNNDNSVIRVDLGNALSGSLVFLGQLNN	93			
PmSEPK1	...MLWVECCG...CCCITRS...GRVFANTTEGDALHSRLSNLIDFNPNVLQSWDPTLVNCTWFHVICNNDNSVIRVDLGNALSGSLVFLGQLNN	89			
AtSEPK1	...MSSVVVFFILLS...LILLPNHSLWLASANTEGDALHSRLSNLIDFNPNVLQSWDPTLVNCTWFHVICNNDNSVIRVDLGNALSGSLVFLGQLNN	94			
PtSEPK1	...MERKVGDLFLWLLLVLLHFFVNLVNGEGDALHSRLSNLIDFNPNVLQSWDPTLVNCTWFHVICNNDNSVIRVDLGNALSGSLVFLGQLNN	96			
StSEPK1	MVKVMERDITVVVSLVV...WLLLVVYHLKLIYANMEGDALHSRLSNLIDFNPNVLQSWDPTLVNCTWFHVICNNDNSVIRVDLGNALSGSLVFLGQLNN	98			
GmSEPK1	...MERKEMALGFI...VVVVVHFLCLIPANMEGDALHSRLSNLIDFNPNVLQSWDPTLVNCTWFHVICNNDNSVIRVDLGNALSGSLVFLGQLNN	93			
StSEPK1	MVKVMERDITVVVSLVV...WLLLVVYHLKLIYANMEGDALHSRLSNLIDFNPNVLQSWDPTLVNCTWFHVICNNDNSVIRVDLGNALSGSLVFLGQLNN	98			
VvSEPK1	...MEG...EVVVLTLLLCLLHFFSFIISANMEGDALHSRLSNLIDFNPNVLQSWDPTLVNCTWFHVICNNDNSVIRVDLGNALSGSLVFLGQLNN	93			
GhSEPK1	...MEGSKVKSIVLVCILSVLLHFFWILISANVEGDALHSRLSNLIDFNPNVLQSWDPTLVNCTWFHVICNNDNSVIRVDLGNALSGSLVFLGQLNN	96			
ZmSEPK1	...MAASLRNWSA...VVVSVVGVVFPVANTTEGDALYSRLSNLIDFNPNVLQSWDPTLVNCTWFHVICNNDNSVIRVDLGNALSGSLVFLGQLNN	93			
OsSEPK1	...MAAHRNAVAV...LRLRVVFAARVLANMEGDALHSRLSNLIDFNPNVLQSWDPTLVNCTWFHVICNNDNSVIRVDLGNALSGSLVFLGQLNN	93			
MtSEPK1	...MEETKFCALAFICA...FLLLLHFLNVLVSNMEGDALHSRLSNLIDFNPNVLQSWDPTLVNCTWFHVICNNDNSVIRVDLGNALSGSLVFLGQLNN	96			
	<b>signal peptide</b>	<b>ZIP</b>	<b>LRR1</b>		
LaSEPK1	LQYLELNSNIISEFPELGNLNLVSLDLYLNNTGPIEELGKSLRFLRLNNSISVETPELSLITLITLQVLDLSNNMLAEVFAANGSFLFTFIS		193		
AaSEPK1	LQYLELNSNIISEFPELGNLNLVSLDLYLNNTGPIEELGKSLRFLRLNNSISVETPELSLITLITLQVLDLSNNMLAEVFAANGSFLFTFIS		193		
PmSEPK1	LQYLELNSNIISEFPELGNLNLVSLDLYLNNTGPIEELGKSLRFLRLNNSISVETPELSLITLITLQVLDLSNNMLAEVFAANGSFLFTFIS		189		
AtSEPK1	LQYLELNSNIISEFPELGNLNLVSLDLYLNNTGPIEELGKSLRFLRLNNSISVETPELSLITLITLQVLDLSNNMLAEVFAANGSFLFTFIS		194		
PtSEPK1	LQYLELNSNIISEFPELGNLNLVSLDLYLNNTGPIEELGKSLRFLRLNNSISVETPELSLITLITLQVLDLSNNMLAEVFAANGSFLFTFIS		196		
StSEPK1	LQYLELNSNIISEFPELGNLNLVSLDLYLNNTGPIEELGKSLRFLRLNNSISVETPELSLITLITLQVLDLSNNMLAEVFAANGSFLFTFIS		198		
GmSEPK1	LQYLELNSNIISEFPELGNLNLVSLDLYLNNTGPIEELGKSLRFLRLNNSISVETPELSLITLITLQVLDLSNNMLAEVFAANGSFLFTFIS		193		
StSEPK1	LQYLELNSNIISEFPELGNLNLVSLDLYLNNTGPIEELGKSLRFLRLNNSISVETPELSLITLITLQVLDLSNNMLAEVFAANGSFLFTFIS		198		
VvSEPK1	LQYLELNSNIISEFPELGNLNLVSLDLYLNNTGPIEELGKSLRFLRLNNSISVETPELSLITLITLQVLDLSNNMLAEVFAANGSFLFTFIS		193		
GhSEPK1	LQYLELNSNIISEFPELGNLNLVSLDLYLNNTGPIEELGKSLRFLRLNNSISVETPELSLITLITLQVLDLSNNMLAEVFAANGSFLFTFIS		196		
ZmSEPK1	LQYLELNSNIISEFPELGNLNLVSLDLYLNNTGPIEELGKSLRFLRLNNSISVETPELSLITLITLQVLDLSNNMLAEVFAANGSFLFTFIS		193		
OsSEPK1	LQYLELNSNIISEFPELGNLNLVSLDLYLNNTGPIEELGKSLRFLRLNNSISVETPELSLITLITLQVLDLSNNMLAEVFAANGSFLFTFIS		193		
MtSEPK1	LQYLELNSNIISEFPELGNLNLVSLDLYLNNTGPIEELGKSLRFLRLNNSISVETPELSLITLITLQVLDLSNNMLAEVFAANGSFLFTFIS		196		
	<b>LRR2</b>	<b>LRR3</b>	<b>LRR4</b>	<b>LRR5</b>	
LaSEPK1	EGGNFDLCGFVAGKPCPGSFFSPPFFVFFVEFVSGSNGARVQSSSSTGA IAGGVAAGAALLFAAPHIGFAWRRRKEQEHFFDVAEEDPEVHGLQLKR				293
AaSEPK1	EGGNFDLCGFVAGKPCPGSFFSPPFFVFFVEFVSGSNGARVQSSSSTGA IAGGVAAGAALLFAAPHIGFAWRRRKEQEHFFDVAEEDPEVHGLQLKR				293
PmSEPK1	EGGNFDLCGFVAGKPCPGSFFSPPFFVFFVEFVSGSNGARVQSSSSTGA IAGGVAAGAALLFAAPHIGFAWRRRKEQEHFFDVAEEDPEVHGLQLKR				289
AtSEPK1	FANLLDLCGFVAGKPCPGSFFSPPFFVFFVEFVSGSNGARVQSSSSTGA IAGGVAAGAALLFAAPHIGFAWRRRKEQEHFFDVAEEDPEVHGLQLKR				289
PtSEPK1	FANLLDLCGFVAGKPCPGSFFSPPFFVFFVEFVSGSNGARVQSSSSTGA IAGGVAAGAALLFAAPHIGFAWRRRKEQEHFFDVAEEDPEVHGLQLKR				291
StSEPK1	FANLLDLCGFVAGKPCPGSFFSPPFFVFFVEFVSGSNGARVQSSSSTGA IAGGVAAGAALLFAAPHIGFAWRRRKEQEHFFDVAEEDPEVHGLQLKR				293
GmSEPK1	FANLLDLCGFVAGKPCPGSFFSPPFFVFFVEFVSGSNGARVQSSSSTGA IAGGVAAGAALLFAAPHIGFAWRRRKEQEHFFDVAEEDPEVHGLQLKR				288
StSEPK1	FANLLDLCGFVAGKPCPGSFFSPPFFVFFVEFVSGSNGARVQSSSSTGA IAGGVAAGAALLFAAPHIGFAWRRRKEQEHFFDVAEEDPEVHGLQLKR				293
VvSEPK1	FANLLDLCGFVAGKPCPGSFFSPPFFVFFVEFVSGSNGARVQSSSSTGA IAGGVAAGAALLFAAPHIGFAWRRRKEQEHFFDVAEEDPEVHGLQLKR				288
GhSEPK1	FANLLDLCGFVAGKPCPGSFFSPPFFVFFVEFVSGSNGARVQSSSSTGA IAGGVAAGAALLFAAPHIGFAWRRRKEQEHFFDVAEEDPEVHGLQLKR				291
ZmSEPK1	FANLLDLCGFVAGKPCPGSFFSPPFFVFFVEFVSGSNGARVQSSSSTGA IAGGVAAGAALLFAAPHIGFAWRRRKEQEHFFDVAEEDPEVHGLQLKR				287
OsSEPK1	FANLLDLCGFVAGKPCPGSFFSPPFFVFFVEFVSGSNGARVQSSSSTGA IAGGVAAGAALLFAAPHIGFAWRRRKEQEHFFDVAEEDPEVHGLQLKR				288
MtSEPK1	FANLLDLCGFVAGKPCPGSFFSPPFFVFFVEFVSGSNGARVQSSSSTGA IAGGVAAGAALLFAAPHIGFAWRRRKEQEHFFDVAEEDPEVHGLQLKR				291
	<b>SPP</b>	<b>TM</b>			
LaSEPK1	FSLRELQVATIDFSNKNILGRGGFGKVKYGRILADGSLVAVKRLKEERTPGGELQFQTEVEMISMAVHRNLLRLRGFCMTFTRILLVYPMANGSVASCLR				393
AaSEPK1	FSLRELQVATIDFSNKNILGRGGFGKVKYGRILADGSLVAVKRLKEERTPGGELQFQTEVEMISMAVHRNLLRLRGFCMTFTRILLVYPMANGSVASCLR				393
PmSEPK1	FSLRELQVATIDFSNKNILGRGGFGKVKYGRILADGSLVAVKRLKEERTPGGELQFQTEVEMISMAVHRNLLRLRGFCMTFTRILLVYPMANGSVASCLR				389
AtSEPK1	FSLRELQVATIDFSNKNILGRGGFGKVKYGRILADGSLVAVKRLKEERTPGGELQFQTEVEMISMAVHRNLLRLRGFCMTFTRILLVYPMANGSVASCLR				389
PtSEPK1	FSLRELQVATIDFSNKNILGRGGFGKVKYGRILADGSLVAVKRLKEERTPGGELQFQTEVEMISMAVHRNLLRLRGFCMTFTRILLVYPMANGSVASCLR				391
StSEPK1	FSLRELQVATIDFSNKNILGRGGFGKVKYGRILADGSLVAVKRLKEERTPGGELQFQTEVEMISMAVHRNLLRLRGFCMTFTRILLVYPMANGSVASCLR				393
GmSEPK1	FSLRELQVATIDFSNKNILGRGGFGKVKYGRILADGSLVAVKRLKEERTPGGELQFQTEVEMISMAVHRNLLRLRGFCMTFTRILLVYPMANGSVASCLR				388
StSEPK1	FSLRELQVATIDFSNKNILGRGGFGKVKYGRILADGSLVAVKRLKEERTPGGELQFQTEVEMISMAVHRNLLRLRGFCMTFTRILLVYPMANGSVASCLR				393
VvSEPK1	FSLRELQVATIDFSNKNILGRGGFGKVKYGRILADGSLVAVKRLKEERTPGGELQFQTEVEMISMAVHRNLLRLRGFCMTFTRILLVYPMANGSVASCLR				388
GhSEPK1	FSLRELQVATIDFSNKNILGRGGFGKVKYGRILADGSLVAVKRLKEERTPGGELQFQTEVEMISMAVHRNLLRLRGFCMTFTRILLVYPMANGSVASCLR				391
ZmSEPK1	FSLRELQVATIDFSNKNILGRGGFGKVKYGRILADGSLVAVKRLKEERTPGGELQFQTEVEMISMAVHRNLLRLRGFCMTFTRILLVYPMANGSVASCLR				387
OsSEPK1	FSLRELQVATIDFSNKNILGRGGFGKVKYGRILADGSLVAVKRLKEERTPGGELQFQTEVEMISMAVHRNLLRLRGFCMTFTRILLVYPMANGSVASCLR				388
MtSEPK1	FSLRELQVATIDFSNKNILGRGGFGKVKYGRILADGSLVAVKRLKEERTPGGELQFQTEVEMISMAVHRNLLRLRGFCMTFTRILLVYPMANGSVASCLR				391
	<b>serine/threonine kinase</b>				
LaSEPK1	ERAFNDFPFDWTRKRIALGSARGLSYLHDCDPKIIHRDVKAANILLDEEFVAVGDFGLAKLMDYKDHVTTAVRGTIGHIAPEYLSLSTGRSSEKTDVF				493
AaSEPK1	ERAFNDFPFDWTRKRIALGSARGLSYLHDCDPKIIHRDVKAANILLDEEFVAVGDFGLAKLMDYKDHVTTAVRGTIGHIAPEYLSLSTGRSSEKTDVF				493
PmSEPK1	ERAFNDFPFDWTRKRIALGSARGLSYLHDCDPKIIHRDVKAANILLDEEFVAVGDFGLAKLMDYKDHVTTAVRGTIGHIAPEYLSLSTGRSSEKTDVF				489
AtSEPK1	ERAFNDFPFDWTRKRIALGSARGLSYLHDCDPKIIHRDVKAANILLDEEFVAVGDFGLAKLMDYKDHVTTAVRGTIGHIAPEYLSLSTGRSSEKTDVF				489
PtSEPK1	ERAFNDFPFDWTRKRIALGSARGLSYLHDCDPKIIHRDVKAANILLDEEFVAVGDFGLAKLMDYKDHVTTAVRGTIGHIAPEYLSLSTGRSSEKTDVF				491
StSEPK1	ERAFNDFPFDWTRKRIALGSARGLSYLHDCDPKIIHRDVKAANILLDEEFVAVGDFGLAKLMDYKDHVTTAVRGTIGHIAPEYLSLSTGRSSEKTDVF				493
GmSEPK1	ERAFNDFPFDWTRKRIALGSARGLSYLHDCDPKIIHRDVKAANILLDEEFVAVGDFGLAKLMDYKDHVTTAVRGTIGHIAPEYLSLSTGRSSEKTDVF				488
StSEPK1	ERAFNDFPFDWTRKRIALGSARGLSYLHDCDPKIIHRDVKAANILLDEEFVAVGDFGLAKLMDYKDHVTTAVRGTIGHIAPEYLSLSTGRSSEKTDVF				493
VvSEPK1	ERAFNDFPFDWTRKRIALGSARGLSYLHDCDPKIIHRDVKAANILLDEEFVAVGDFGLAKLMDYKDHVTTAVRGTIGHIAPEYLSLSTGRSSEKTDVF				488
GhSEPK1	ERAFNDFPFDWTRKRIALGSARGLSYLHDCDPKIIHRDVKAANILLDEEFVAVGDFGLAKLMDYKDHVTTAVRGTIGHIAPEYLSLSTGRSSEKTDVF				491
ZmSEPK1	ERAFNDFPFDWTRKRIALGSARGLSYLHDCDPKIIHRDVKAANILLDEEFVAVGDFGLAKLMDYKDHVTTAVRGTIGHIAPEYLSLSTGRSSEKTDVF				487
OsSEPK1	ERAFNDFPFDWTRKRIALGSARGLSYLHDCDPKIIHRDVKAANILLDEEFVAVGDFGLAKLMDYKDHVTTAVRGTIGHIAPEYLSLSTGRSSEKTDVF				487
MtSEPK1	ERAFNDFPFDWTRKRIALGSARGLSYLHDCDPKIIHRDVKAANILLDEEFVAVGDFGLAKLMDYKDHVTTAVRGTIGHIAPEYLSLSTGRSSEKTDVF				491
	<b>serine/threonine kinase</b>				
LaSEPK1	GYGIMLELITGQRAFDLARLANDDDVMLDWVHGLLKERKEMLVDPDKNNVVEAEVEQLIQVALLCTGSEMDRFKMSVVRMLEGGDLAERWDEWQ				593
AaSEPK1	GYGIMLELITGQRAFDLARLANDDDVMLDWVHGLLKERKEMLVDPDKNNVVEAEVEQLIQVALLCTGSEMDRFKMSVVRMLEGGDLAERWDEWQ				593
PmSEPK1	GYGIMLELITGQRAFDLARLANDDDVMLDWVHGLLKERKEMLVDPDKNNVVEAEVEQLIQVALLCTGSEMDRFKMSVVRMLEGGDLAERWDEWQ				589
AtSEPK1	GYGIMLELITGQRAFDLARLANDDDVMLDWVHGLLKERKEMLVDPDKNNVVEAEVEQLIQVALLCTGSEMDRFKMSVVRMLEGGDLAERWDEWQ				589
PtSEPK1	GYGIMLELITGQRAFDLARLANDDDVMLDWVHGLLKERKEMLVDPDKNNVVEAEVEQLIQVALLCTGSEMDRFKMSVVRMLEGGDLAERWDEWQ				591
StSEPK1	GYGIMLELITGQRAFDLARLANDDDVMLDWVHGLLKERKEMLVDPDKNNVVEAEVEQLIQVALLCTGSEMDRFKMSVVRMLEGGDLAERWDEWQ				593
GmSEPK1	GYGIMLELITGQRAFDLARLANDDDVMLDWVHGLLKERKEMLVDPDKNNVVEAEVEQLIQVALLCTGSEMDRFKMSVVRMLEGGDLAERWDEWQ				588
StSEPK1	GYGIMLELITGQRAFDLARLANDDDVMLDWVHGLLKERKEMLVDPDKNNVVEAEVEQLIQVALLCTGSEMDRFKMSVVRMLEGGDLAERWDEWQ				593
VvSEPK1	GYGIMLELITGQRAFDLARLANDDDVMLDWVHGLLKERKEMLVDPDKNNVVEAEVEQLIQVALLCTGSEMDRFKMSVVRMLEGGDLAERWDEWQ				588
GhSEPK1	GYGIMLELITGQRAFDLARLANDDDVMLDWVHGLLKERKEMLVDPDKNNVVEAEVEQLIQVALLCTGSEMDRFKMSVVRMLEGGDLAERWDEWQ				591
ZmSEPK1	GYGIMLELITGQRAFDLARLANDDDVMLDWVHGLLKERKEMLVDPDKNNVVEAEVEQLIQVALLCTGSEMDRFKMSVVRMLEGGDLAERWDEWQ				587
OsSEPK1	GYGIMLELITGQRAFDLARLANDDDVMLDWVHGLLKERKEMLVDPDKNNVVEAEVEQLIQVALLCTGSEMDRFKMSVVRMLEGGDLAERWDEWQ				588
MtSEPK1	GYGIMLELITGQRAFDLARLANDDDVMLDWVHGLLKERKEMLVDPDKNNVVEAEVEQLIQVALLCTGSEMDRFKMSVVRMLEGGDLAERWDEWQ				591
	<b>serine/threonine kinase</b>				
LaSEPK1	KVEVRSQEVVLPFRNSENIVDSTDNLHAVELSGE				629
AaSEPK1	KVEVRSQEVVLPFRNSENIVDSTDNLHAVELSGE				629
PmSEPK1	KVEVRSQEVVLPFRNSENIVDSTDNLHAVELSGE				625
AtSEPK1	KVEVRSQEVVLPFRNSENIVDSTDNLHAVELSGE				624
PtSEPK1	KVEVRSQEVVLPFRNSENIVDSTDNLHAVELSGE				626
StSEPK1	KVEVRSQEVVLPFRNSENIVDSTDNLHAVELSGE				628
GmSEPK1	KVEVRSQEVVLPFRNSENIVDSTDNLHAVELSGE				623
StSEPK1	KVEVRSQEVVLPFRNSENIVDSTDNLHAVELSGE				628
VvSEPK1	KVEVRSQEVVLPFRNSENIVDSTDNLHAVELSGE				623
GhSEPK1	KVEVRSQEVVLPFRNSENIVDSTDNLHAVELSGE				626
ZmSEPK1	KVEVRSQEVVLPFRNSENIVDSTDNLHAVELSGE				621
OsSEPK1	KVEVRSQEVVLPFRNSENIVDSTDNLHAVELSGE				623
MtSEPK1	KVEVRSQEVVLPFRNSENIVDSTDNLHAVELSGE				626
	<b>C-terminal</b>				

图 5 13 个物种的 SERK1 蛋白一级结构序列比对

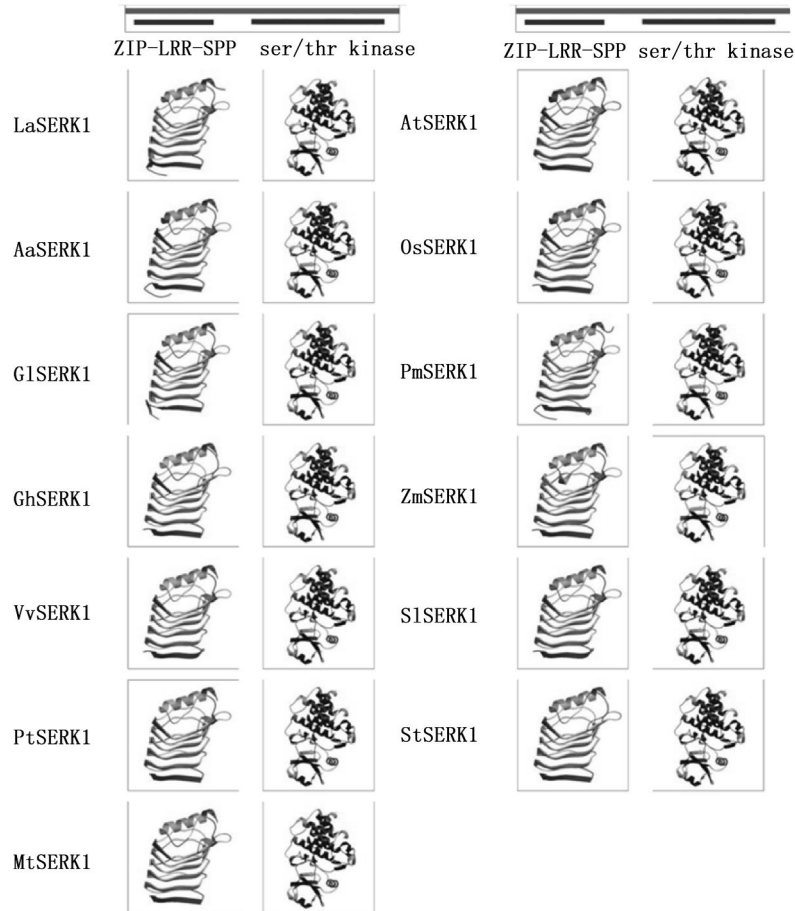
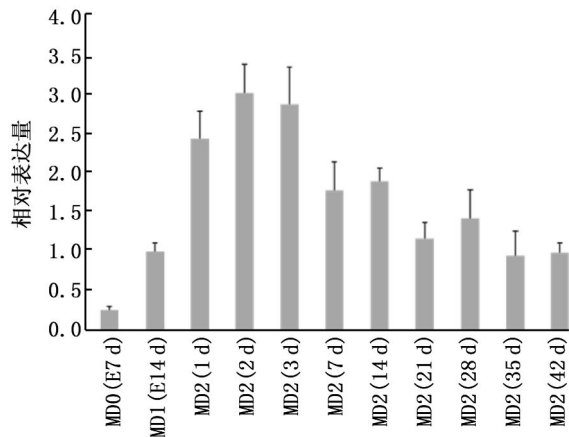


图6 Swiss-model 预测 LaSERK1 蛋白高级结构



MD0 (E7 d): 无激素基本培养基上培养 7 d 的愈伤组织; MD1 (E14 d): 继代培养基上的原胚团; MD2 (1~3 d): 早期单胚时期细胞团; MD2 (7 d): 中期单胚时期细胞团; MD2 (14 d) 中期单胚; MD2 (21 d) 晚期单胚; MD2 (28 d) 早期子叶胚细胞团; MD2 (35 d) 中期子叶胚; MD2 (42 d) 晚期子叶胚。

图7 不同培养条件下 *LaSERK1* 基因在细胞中的表达模式

### 3 结论与讨论

编码氨基酸序列多重比对分析发现, *LaSERK1* 与其它植物中的 *SERK1* 有很高的同源性, 且含有许多相同的保守结构域, 具有 *SERK* 基因的典型序列特征, 有些结构域甚至完全一样。不同植物的 *SERK1* 基因编码的蛋白质分子量、氨基酸组成都很接近。通过 ExPASy 网站的工具 Compute pI/Mw ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) 对几个物种的 *SERK1* 蛋白分子量和等电点进行预测发现, *LaSERK1* 蛋白 (630 个氨基酸) 分子量约为 69.6 kD, 预测 pI 为 5.69; 拟南芥 *AtSERK1* 蛋白 (625 个氨基酸) 分子量约为 69 kD, 预测 pI 为 5.25; 水稻 *OsSERK1* 蛋白 (628 个氨基酸), 分子量 69.5 kD, 预测 pI 为 5.98; 南洋杉 *AaSERK1* 蛋白 (630 个氨基酸), 分子量 69.2 kD, 预测 pI 为 5.83; 马尾松 *PmSERK1* 蛋白 (626 个氨基酸), 分子量 69.5 kD, 预测 pI 为 5.82。这些蛋白分子量和等电点的相似性可能意味着它们结构的保守性。从图 6 所示各

个物种的 *SERK1* 蛋白高级结构的极高相似度可以推断,它们可能在各自的细胞内起着相似甚至相同的作用。

由图7可看出:在成熟培养基中,*LaSERK1* 的表达明显上调,第2天便达到最高,比无激素时高出10倍;而到第7天时表达量已经下降到起初的近50%,之后的各时期表达量基本呈递减趋势。由于 *LaSERK1* 的高表达是处于愈伤组织向体细胞胚胎转变过程的早期,所以 *LaSERK1* 很可能是在早期体细胞胚胎发生过程中起作用,即其在 ABA 的诱导下启动了体胚发育过程,而在体胚发育后期 *LaSERK1* 的作用不再那么明显,可起到维持体胚发育过程的作用。在此过程中,*LaSERK1* 可能是受成熟培养基中激素 ABA 的诱导,而 MD0 (E7 d) 和 MD1 (E14 d) 的差异是受激素 2,4-D 和 BA 的影响,说明 *LaSERK1* 可能受这2种激素诱导,但此诱导不如 ABA 的诱导明显。以往的研究证明, *SERK1* 基因可以受多种激素诱导,包括 2,4-D<sup>[3]</sup>、ABA<sup>[14]</sup> 等,此外 *SERK1* 基因也可受病害防御信号分子诱导表达,如水杨酸 SA 可诱导水稻 Os*SERK1* 的高表达等<sup>[14]</sup>,说明 *SERK1* 基因也参与了病害防御过程。

落叶松 *LaSERK1* 在体胚发生整个过程中均表达,但在体胚发生早期表达量高,在无激素基本培养基中表达量很低。其他物种中也同样有表达特异性,如胡萝卜 *DcSERK* 只在胚性细胞中表达且只表达到心形期<sup>[3]</sup>;拟南芥 *AtSERK1* 在合子胚中也只表达到心形期;蜜柑 *CitSERK1* 只表达在胚性细胞中,而不在非胚性细胞内表达<sup>[27]</sup>。南京林业大学的高燕等<sup>[19]</sup>发现,马尾松 *PmSERK1* 在主要的组织器官(根、茎、针叶等)略有表达,但在诱导培养的非胚性愈伤中没有检测到表达,而在经继代培养的胚性愈伤中表达很高且逐渐增加,且在培养 20 d 时达到最高。南洋杉的 *AaSERK1* 则在无激素培养基中无表达,在成熟培养基中高表达<sup>[20]</sup>。这些物种中 *SERK1* 基因的时期或组织表达都有特异性,例如 *SERK1* 基因是在大部分植物体细胞胚胎发育过程中只在胚性细胞中表达,意味着 *SERK1* 基因在各物种体胚发生过程和胚性细胞产生中发挥重要作用。

深入研究体细胞胚发生分子机理有助于更加清晰地了解植物体细胞胚的发生过程,对解决体细胞胚发生过程中存在的问题具有重要的指导作用。

## 参考文献:

- [1] Zhang S, Zhou J, Han S, *et al.* Four abiotic stress-induced miRNA families differentially regulated in the embryogenic and non-embryogenic callus tissues of *Larix kaempferi* (Lamb.) Carr. [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2010, 398(3): 355-360
- [2] Cairney J, Pullman G S. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis[J]. New Phytologist, 2007, 176(3): 511-536
- [3] Schmidt E D, Guzzo F, Toonen M A, *et al.* A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos[J]. Development, 1997, 124(10): 2049-2062
- [4] Lotan T, Ohto M, Yee K M, *et al.* *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 Is Sufficient to Induce Embryo Development in Vegetative Cells[J]. Cell, 1998, 93(7): 1195-1205
- [5] Clark S E, Williams R W, Meyerowitz E M. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*[J]. Cell, 1997, 89(4): 575-585
- [6] Mayer K F X, Schoof H, Haecker A, *et al.* Role of *WUSCHEL* in Regulating Stem Cell Fate in the *Arabidopsis* Shoot Meristem [J]. Cell, 1998, 95(6): 805-815
- [7] Espelund M, Sæbøe-Larssen S, Hughes D W, *et al.* Late embryogenesis-abundant genes encoding proteins with different numbers of hydrophilic repeats are regulated differentially by abscisic acid and osmotic stress[J]. The Plant Journal, 1992, 2(2): 241-252
- [8] Boucheron E, Healy J H S, Bajon C, *et al.* Ectopic expression of *Arabidopsis* *CYCD2* and *CYCD3* in tobacco has distinct effects on the structural organization of the shoot apical meristem[J]. Journal of experimental botany, 2005, 56(409): 123-134
- [9] Kreuger M, van Holst G J. Arabinogalactan proteins and plant differentiation[J]. Plant molecular biology, 1996, 30(6): 1077-1086
- [10] Zhang X S, Choi J H, Heinz J, *et al.* Domain-specific positive selection contributes to the evolution of *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinase (*LRR RLK*) genes[J]. Journal of molecular evolution, 2006, 63(5): 612-621
- [11] Becraft P W. Receptor kinase signaling in plant development[J]. Annual review of cell and developmental biology, 2002, 18(1): 163-192
- [12] Hecht V, Vielle-Calzada J P, Hartog M V, *et al.* The *Arabidopsis* *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture[J]. Plant Physiology, 2001, 127(3): 803-816
- [13] Baudino S, Hansen S, Brettschneider R, *et al.* Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the *SERK* gene family[J]. Planta, 2001, 213(1): 1-10
- [14] Hu H, Xiong L, Yang Y. Rice *SERK1* gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection[J]. Planta, 2005, 222(1): 107-117
- [15] Budiman M A, Mao L, Wood T C, *et al.* A deep-coverage tomato BAC library and prospects toward development of an STC framework for genome sequencing[J]. Genome research, 2000, 10(1): 129

- 136

- [16] de Oliveira Santos M, Romano E, Yotoko K S C, *et al.* Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (*SERK*) gene expressed during somatic embryogenesis[J]. *Plant Science*, 2005, 168(3): 723 - 729
- [17] Thomas C, Meyer D, Himber C, *et al.* Spatial expression of a sunflower *SERK* gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2004, 42(1): 35 - 42
- [18] Nolan K E, Irwanto R R, Rose R J. Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago truncatula* root - forming and embryogenic cultures[J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(1): 218 - 230
- [19] 高 燕, 席梦利, 王桂凤, 等. 马尾松体细胞胚胎发生相关基因 *PmSERK1* 的克隆与表达分析[J]. *分子植物育种*, 2010(1): 53 - 58
- [20] Steiner N, Santa-Catarina C, Guerra M P, *et al.* A gymnosperm homolog of *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE-1 (SERK1)* is expressed during somatic embryogenesis[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2012, 109(1): 41 - 50
- [21] 齐力旺. 华北落叶松体细胞胚胎发生及遗传转化实验系统的建立[J]. *实验生物学报*, 2000, 33(4): 354 - 365
- [22] Ren J, Wen L, Gao X, *et al.* DOG 1.0: illustrator of protein domain structures[J]. *Cell research*, 2009, 19(2): 271 - 273
- [23] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, *et al.* The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(2): 195 - 201
- [24] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling[J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(15): 2714 - 2723
- [25] Schwede T, Kopp J, Guex N, *et al.* SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server[J]. *Nucleic acids research*, 2003, 31(13): 3381 - 3385
- [26] Kateřina S, Zuzana V, Lukáš F, *et al.* The role of actin isoforms in somatic embryogenesis in Norway spruce[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10:89
- [27] Shimada T, Hirabayashi T, Endo T, *et al.* Isolation and characterization of the somatic embryogenesis receptor-like kinase gene homologue (*CitSERK1*) from Citrus unshiu Marc[J]. *Scientia Horticulturae*, 2005, 103(2): 233 - 238