

苹果属无融合生殖 *SERK1* 基因的克隆与 生物信息学分析

张丽杰¹, Mohamed hamad², 董文轩^{2*}, 郭苏漫², 孟庆娇³

(1. 沈阳农业大学林学院, 沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学园艺学院, 辽宁 沈阳 110866;
3. 辽宁省本溪市桓仁县林业局, 辽宁 本溪 117201)

摘要: [目的]为探讨苹果属植物无融合生殖分子机制。[方法]以苹果属平邑甜茶及杂种后代 33#为试材,以苹果基因组 CDS 序列设计引物,通过 PCR 扩增技术克隆出 *SERK* 同源基因的 cDNA 全长序列,命名为 *MhSERK1* 和 *MhdSERK1* (GenBank 登录号 JQ231273 和 JQ231272),利用实时定量 RTqPCR 的方法检测了这两个基因在平邑甜茶和杂种后代各组织和器官中的表达模式。[结果]序列分析显示 *MhSERK1* 和 *MhdSERK1* 编码区序列全长为 1 899 bp 和 1 881 bp,分别编码 632 和 626 个氨基酸,其氨基酸序列与其他植物的 *SERK1* 同源基因所编码的氨基酸同源性都在 80% 以上,特别是与葡萄科龙眼品种同源性最高,高达 92.56%,与模式植物拟南芥、烟草等植物的 *SERK* 同源基因都具有很高的同源性。实时定量 PCR 结果表明,在平邑甜茶和杂种后代不同组织、花器官中 *SERK1* 基因的表达量存在差异,其中在子房中的表达量最高,在营养生长的组织中表达量很低,在平邑甜茶花蕾期的子房中表达量最高。[结论]推测该基因在平邑甜茶和杂种后代的生殖发育过程中可能发挥重要作用。

关键词: 苹果属; *SERK*; 同源基因; 生物信息学分析

中图分类号: S661.1

文献标识码: A

Isolation and Bioinformatics Analysis of Apomixis *SERK1* Genes in *Malus*

ZHANG Li-jie¹, MOHAMED Hamad², DONG Wen-xuan², GUO Su-man², MENG Qing-jiao³

(1. College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning, China; 2. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning, China; 3. Forestry Bureau of Huanren County, Benxi 117201, Liaoning, China)

Abstract: The plants *Malus hupehensis* var. *pingyiensis* Jiang (Pingyi Tiancha) and a hybrid strain 33# were employed as the experimental materials. By PCR techniques and primers which were designed from the CDS sequences of apple genome, the full-length cDNA sequences of *SERK* homologous genes were cloned, which were named as *MhSERK1* and *MhdSERK1* (GenBank accession No. JQ231273 and JQ231272), and then *SERKs* expressions were detected in different tissues and organs of Pingyi Tiancha and the hybrid strain through Real-time quantitative PCR method. The results showed that the length of coding region sequences about *MhSERK1* and *MhdSERK1* were 1 899 bp and 1 881 bp, which respectively encoded 632 and 626 amino acids. Compared with other plants, the amino acid sequence homology of *SERK1* was 80% or more, especially with Longan grape (Vitaceae), which could reach 92.56%, and it also had a high homology with the model plant *Arabidopsis thaliana* and tobacco. The results of real-time quantitative PCR showed that the expression levels of *SERK1* gene were different among the different tissues and organs of Pingyi Tiancha and hybrid strain, which was high expression levels in the ovary, very low expression levels in vegetative tissues, and the highest expression levels in the ovary of the flower bud of Pingyi Tiancha, indi-

收稿日期: 2015-06-26

基金项目: 国家自然科学基金“苹果属四倍性皱叶矮生株系的生殖特征及形成机理研究”(30971975)

作者简介: 张丽杰(1972—), 博士, 副教授。硕士生导师; 主要研究方向: 林木种质资源和生物技术。E-mail: zhanglijie_106@sina.com

* 通讯作者: 博士, 教授。博士生导师; 主要研究方向: 果树种质资源与评价。E-mail: wxdong63@126.com。

cating that *SERK1* gene played an important role in the reproductive and developmental processes of Pingyi Tiancha and hybrid strain.

Key words: *Malus*; *SERK*; homologue gene; bioinformatics analysis

平邑甜茶 (*Malus hupehensis* var. *pingyiensis* Jiang) 是蔷薇科 (Rosaceae) 苹果属 (*Malus* Mill) 湖北海棠 (*Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd.) 的一个变种, 是典型的无融合生殖型三倍体植物^[1-3]。

平邑甜茶具有高度的无融合生殖能力, 是无融合生殖型矮化砧木育种的重要母本材料^[4]。由于苹果属无融合生殖植物多为兼性无融合生殖, 利用这一特点课题组以平邑甜茶为母本, 山定子 (*Malus baccata* (Linn.) Borkh.) 为父本进行有性杂交后获得了四倍性皱叶矮生型杂种后代, 而且四倍性的来源应该是平邑甜茶的三倍性加上父本花粉的单倍性构成^[5-6], 这些杂种后代经鉴定无融合生殖能力显著下降^[7-8]。而关于无融合生殖能力下降的原因及分子机理方面的国内外未见报道。林庆光等^[9]研究表明, *SERK* 基因参与孢子体的发育仅在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 中有报到, 通过对拟南芥 *SERKs* 基因的研究发现, *SERK* 基因参与雄蕊发育, *AtSERK1* 和 *AtSERK2* 在拟南芥的营养组织和生殖组织中都有表达; 在生殖器官中, *AtSERK1* 和 *AtSERK2* 在花药发育前 6 个阶段 *SERK1* 和 *SERK2* 广泛表达, 之后在花药发育晚期, 两基因集中在绒毡层中表达^[10-14]。因此, 两基因不仅参与了孢子体的发育, 而且二者之间可能存在功能上的互补作用。

鉴于 *SERK* 及其同源基因在高等植物小孢子发育和生殖发育过程中的重要作用, 对苹果属平邑甜茶和杂种后代中 *SERK* 同源基因进行克隆和表达情况进行研究, 通过分析 *SERK* 基因在植物无融合生殖中的具体作用方式, 探讨苹果属植物无融合生殖分子机制与其他模式植物之间的差异, 为进一步深入研究无融合生殖的遗传机制, 为利用无融合生殖固定杂种优势开辟一条新的途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试材取自沈阳农业大学园艺学院果树试验基地, 于 2010—2013 年 5 月中上旬选取苹果属三倍性平邑甜茶 (3n) 和四倍性杂种后代 (4n) 皱叶矮生株系萌发的幼嫩叶片、发育时期的子房、花各部分器官, 每份样品约 1~3 g, 用锡箔纸包裹后液氮速冻

放入 -70℃ 冰箱冷冻保存备用。

1.2 方法

1.2.1 核酸提取 采用常规 CTAB 法^[15] 提取平邑甜茶和杂种后代株系基因组 DNA, 利用 TIANGEN 多糖多酚试剂盒提取 RNA。利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测核酸的完整性, 用 DU800 核酸蛋白分析仪 (Beckman Coulter, USA) 检测核酸的纯度。

1.2.2 引物设计 依据 NCBI 美国生物技术公司 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中注册的 *Arabidopsis*, *carrot*, *cacao*, *Citrus* and *Medicago* 的 *SERK* 基因 CDS 序列, Clustal W 多重序列比对, 根据 *SERK* 基因的保守序列设计引物用于扩增 *SERK* 基因家族片段; 根据已获得的 *SERK1* 基因片段, 经过 NCBI 数据库 Blast 分析, 确定该 *SERK* 基因家族片段在金冠苹果基因组序列的位置, 与 MDPO00043246 编码的未注释基因功能的序列同源性达到 100%, 判断已分离获得平邑甜茶和杂种后代的 *SERK* 基因片段; 根据查找到的与 *SERK* 基因同源的 CDS 序列, 利用 Primer Primer 5.0 软件分别设计上下游引物, 扩增 cDNA 全长和 DNA 全长; 引物由北京赛百盛生物技术有限公司合成。其序列列表 1。

表 1 用于扩增平邑甜茶和杂种后代 *SERK* 基因引物

引物	序列 (5'→3')	用途
<i>SERK1</i>	F: GAAGTTCATCTTGGGCAGC R: CCCACAACAGCCTCAAAC	<i>SERK1</i> 基因片段的分离
<i>SERK1</i>	F: ATGACGCTCTCCACCTCTGTTC R: TCATCTAGGACCGACAACACTCAT	<i>SERK1</i> cDNA、DNA 全长
<i>SERK1-F</i> <i>SERK1-R</i>	CGTTACTTGTATTATCCTT GGTGAATAATCTTCGGGTC	<i>SERK1</i> 实时定量 RT-PCR
18S-F 18S-R	GTAGTCATATGCTTGTCT GAATGATCGCTCGCCAGCACAAAGG	18 S 实时定量 RT-PCR

1.2.3 PCR 与 RT-PCR RT-PCR 反转录 cDNA 的合成利用宝生物工程 (大连) 有限公司的 Prime-Script™ RT reagent Kit with DNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 作为 PCR 模板备用。

DNA 基因片段克隆, 所用 PCR 反应体系 20 μL: 1 μL DNA 加入 Ex Taq DNA 聚合酶 0.25 μL, 10 × Buffer 2 μL, dNTPs (2.5 mmol · μL⁻¹) 1.6 μL, 正反向引物 (10 μmol) 各 1 μL, DNA 模板 1 μL, 最后用

灭菌水补足到总体积 20 μL 。PCR 反应扩增程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 结束,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

cDNA 和 DNA 全长获得:PCR 反应体系(25 μL)取 1 μL cDNA(DNA)加入 ExTaq DNA 聚合酶 0.4 μL ,Ex Taq Buffer II (TIANGEN) 2.5 μL ,dNTPs (2.5 mmol \cdot μL^{-1})2.0 μL ,引物(10 μmol)各 1 μL ,最后用灭菌水补足到 25 μL 进行 PCR 扩增。PCR 反应扩增程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。用含 EB (0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.2.4 序列测定和分析 利用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒从琼脂糖凝胶中回收 PCR 扩增片段,并与 TA 克隆载体 PGM-T 连接,转化 TOP 大肠杆菌感受态细胞,通过蓝白斑筛选 PCR 鉴定阳性克隆,由北京华大基因科技公司测序。将获得的序列在 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中进行 Blast 检索分析,利用 Clustal X 1.83、DNAMAN6.0 软件进行多序列比对,用 ExPASy 软件在线分析 *SERKI* 基因编码氨基酸的蛋白质结构。

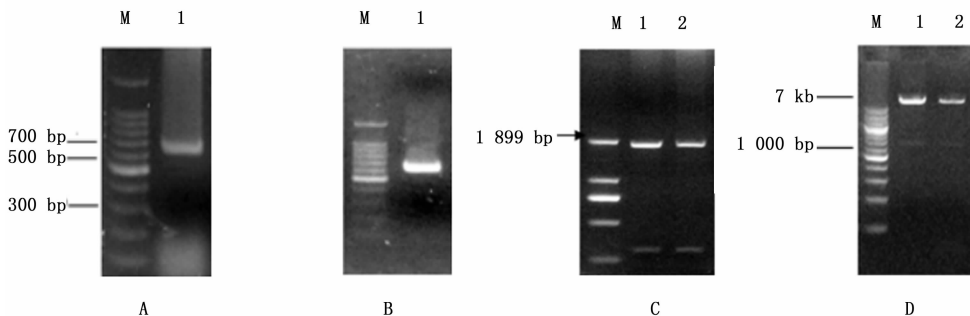
1.2.5 实时定量 RT qPCR 提取总 RNA,利用 TIANGEN 生化科技公司的实时荧光定量试剂盒 2.5

\times real Master Mix (Cat#FP202-02) 进行反转录,根据已获得的 *SERK* 基因片段,利用软件 Primer Premier 5.0 设计 PCR 特异性引物(引物序列见表 1)。实时定量 PCR 反应体积为 20 μL ,1 μL cDNA(RNA 为 2 μg),10 μL 2.5 \times Mix,10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正反向引物各 1 μL ,剩余体积用超纯水补足,每个反应重复 3 次。采用 2 步法反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环,在 PCR 反应的第 2 步收集荧光信号。以 18S rRNA 作为内参基因,超存水模板为阴性对照,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算相对表达量的高低。荧光定量 PCR 使用 TIANGEN 生化有限公司 RealMasterMix (SYBR Green) 试剂盒 (FP202),BioRad iQ5 (admin) 实时定量 PCR 仪上完成。

2 结果与分析

2.1 苹果属 *SERKI* 基因全长的获得

以苹果属平邑甜茶和杂种后代幼嫩叶片基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,分别得到一条长约 700 bp 的特异条带(图 1-A,B),测序结果表明,该片段长度是 705 bp,与蔷薇科玫瑰 (*Rosa rugosa* Thunb.)、拟南芥及烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 等的 *SERK* 同源基因的同源性均在 80% 以上,表明该片段是 *SERK* 的同源基因片段。



A: M; 100 bp DNAMarker; 平邑甜茶 *SERK* 基因片段扩增; 泳道 1: *SERK* 1; B: M; 100 bp DNAMarker; 杂种后代 33# *SERK* 基因家族片段扩增; 泳道 1: *SERKI*; C: M: DL2000; *SERKI* 基因 cDNA 全长序列; 泳道 1: 平邑甜茶; 2: 杂种后代; D: M: DL2000; 平邑甜茶和杂种后代 33# *SERKI* 基因 DNA 全长序列; 泳道 1: 平邑甜茶; 泳道 2: 杂种后代 33#

图 1 平邑甜茶和杂种后代 33# *SERKI* 基因的 PCR 扩增结果

基于已获得的苹果属平邑甜茶和杂种后代的 *SERKI* 同源基因片段,经过 NCBI 数据库 Blast 分析,确定该 *SERK* 基因家族片段在金冠苹果基因组序列的位置,分别与 MDP0000432466 编码的未注释基因功能的序列同源性达到 100%,根据苹果基因组的 *SERK* 基因同源 CDS 序列,利用 Primer Premier 5.0 软件分别设计上下游引物,进行 PCR 扩增,分别

得到平邑甜茶和杂种后代的一条大约 2 000 bp 的特异谱带(图 1-C),克隆测序后结果表明该条带长度分别为 1 899 bp 和 1 881 bp,分别编码 632 和 626 个氨基酸。该 *SERK1* 同源基因在 CDS 长度上与其他植物的核酸序列进行比对,结果表明:与金冠苹果的核酸序列同源性达到 95.01%,与甜橙 (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) (FJ851422.1) 核苷酸序列同源性

达到 86%,说明已经克隆获得了平邑甜茶和杂种后代的 *SERK1* cDNA 全长序列,于是将克隆出的平邑甜茶和杂种后代的 *SERK1* 同源基因分别命名为 *MhSERK1* 和 *MhdSERK1*,并将序列全长提交到 NCBI 数据库中(GeneBank 登录号:JQ231272 和 JQ231273)。

为进一步分析 *SERK1* 基因的外显子和内含子,以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,得到了长约 7 kb 的两条带(图 1 - D);克隆测序结果表明,*MhSERK1* 和 *MhdSERK1* 的 DNA 序列全长分别为 6 886 bp、6 719 bp,均有 11 个外显子,10 个内含子,*MhSERK1* 和 *MhdSERK1* 各内含子长短相近,其中内含子 3 最长 1 695 bp,内含子 1 次之,有 825 bp,内含子 10 为 708 bp,内含子 4 长度为 504 bp,内含子 7 长度为 545 bp,其余内含子较短;*MhSERK1* 和 *MhdSERK1* 的内含子分布与龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) (登录号:HM773391) 和番木瓜 (*Carica papaya* Linn.) (EF661025) 等同源基因类似。

2.2 *MhSERK1* 和 *MhdSERK1* 基因的生物信息学分析

2.2.1 *MhSERK1* 和 *MhdSERK1* 编码蛋白聚类分析及其序列特征

将克隆到的 *MhSERK1*、*MhdSERK1* cDNA 序列利用 DNAMAN 软件进行核苷酸序列同源性分析,结果显示 *MhSERK1*、*MhdSERK1* 编码 632、626 个氨基酸,该类基因编码蛋白的激酶结构域高度保守,而且,这些 *SERK* 基因都具有 1 个 SP 信号肽,1 个亮氨酸拉链结构域,5 个富亮氨酸重复序列结构域 LRR,1 个 SPP 丝氨酸 - 脯氨酸 - 脯氨酸模序,1 个 TM 跨膜结构域以及 3 个胞内激酶活性结构域和 C 末端结构域的特征(图 2),属于典型的 *SERK/LRR-RLKs* 类基因,这一结果与前人研究的相一致^[16]。

为阐明该基因与其他物种的进化关系,利用 CLUSTAL1.8、MEGA4 方法对上述包括 *MhSERK1*、*MhdSERK1* 在内的 8 个物种的 *SERK* 基因的氨基酸序列聚类分析,绘制进化树(图 3),聚类分析可以发现平邑甜茶和杂种后代的 *MhSERK1*、*MhdSERK1* 首先分别与棕榈科植物椰子 *CitSERK1* 和蔷薇科的蔷薇 *RcSERK1* 聚在一起,然后与其它物种的 *SERK/LRR-RLK* 类基因聚在一个大的分支上;分析结果表明 *MhSERK1*、*MhdSERK1* 在进化上属于 *SERK* 同源基因中 *SERK/LRR-RLK* 类基因。

2.2.2 *MhSERK1* 和 *MhdSERK1* 蛋白质结构分析

在获得 *MhSERK1* 和 *MhdSERK1* 核苷酸序列的基础上,用 DNAMAN 软件和 DNAClub 软件对其预测的蛋白质氨基酸序列进行分析,结果表明,*MhSERK1*、*MhdSERK1* 基因共编码 632、626 个氨基酸;用 ProtParam 软件在线分析 *MhSERK1*、*MhdSERK1* 的氨基酸序列理化参数,包括分子质量、理论等电点、氨基酸组成、半衰期、不稳定系数和总平均疏水性等,分析显示:推测平邑甜茶无融合生殖相关 *MhSERK1*、*MhdSERK1* 基因的蛋白分子量分别是 69.58 kDa、68.86 kDa,理论推导半衰期均为 30 h,不稳定参数是 41.26、41.04,属于不稳定蛋白;理论等电点 5.22、5.45。

2.2.3 *MhSERK1* 和 *MhdSERK1* 氨基酸组成及理化性质分析

ProtParam 在线软件对平邑甜茶和杂种后代的 *MhSERK1* 和 *MhdSERK1* 氨基酸组成进行分析;结果表明 *MhSERK1* 和 *MhdSERK1* 氨基酸组成中含有亮氨酸 Leu(L) 最多,为 13.6%;Gly(G) 和 Pro(P) 次之,为 7.8%、7.5%;不含吡咯赖氨酸 Pyl(O) 和半胱氨酸 Sec(U)。ProtParam 程序分析表明,该蛋白带负电荷残基总数(Asp + Glu) 数为 71 个,带正电荷残基(Arg + Lys) 总数为 58 个和 57 个。总的亲水性平均系数为 -0.104 和 -0.118,预测该蛋白属于亲水性蛋白。

2.3 *MhSERK1* 和 *MhdSERK1* 基因表达模式分析

荧光实时定量 RT-PCR 检测结果表明:*MhSERK1* 和 *MhdSERK1* 无论是在三倍体平邑甜茶的子房中,还是在杂种后代的子房中表达量都是最高的,其次是在三倍体平邑甜茶的叶片、雄蕊和雌蕊中,而在四倍体杂种后代的叶片、花瓣、雌蕊中表达量很低,甚至不表达(图 4)。作者还对 *SERK1* 基因在不同花发育时期的表达量进行了检测分析,结果可以看出(图 5):*SERK1* 在平邑甜茶花蕾期的子房中表达量最高,其次是盛花期,花期后的子房中表达量最低;而在杂种后代中花期后子房的表达量最高,其次是花蕾期,在盛花期子房中的表达量最低;从而分析 *SERK1* 基因在平邑甜茶配子形成阶段起到调控作用,而在四倍体杂种后代配子形成后期胚胎发育阶段才开始表达,导致杂种后代的无融合生殖能力下降,可能是主要原因。

MHSERK1 MERKVGNSVCLWFLILVAHPLWMTIWLANMEGDALHNLCTNLEDEPNNVLQSWDP TLLVPGLGLKKNQYLELYSNNSGPTIPRBLG	85
MHDSERK1 MERKVGNSVCLWFLILVAHPLWMTIWLANMEGDALHNLCTNLEDEPNNVLQSWDP TLLVPGLGLKKNQYLELYSNNSGPTIPRBLG	85
ATSERK1 MGRKKFEAFGPFVCLISLLELFLN.SLWLASSNMEGDALHSURANLVDPNNVLQSWDP TLLVPGLGLKKNQYLELYSNNTGPPSPDLG	87
RCSEK1 MDSRLASSLCP LLTILVAHPLWITIMVLSNMEGDALHSURANLVDPNNVLQSWDP TLLVPGLGLKKNQYLELYSNNTGPTIPRBLG	85
STSERK1 MVKVMKEDAVVSLVWVLLILVWH..HLKLIYANMEGDALHSURVNLQDPNNVLQSWDP TLLVPGLGLKKNQYLELYSNNSGPTIPRBLG	88
ZMSERK1 MAASLRWWWAVVFSVVGWVIVVAVNTEGDALYSURQSKDNVNVLQSWDP TLLVPGLGLKKNQYLELYSNNSGPTIPRBLG	83
ZMSERK2 MAASASAGRWWAVVLAVALLGGPQGVAVNTEGDALYSURQSKDNVNVLQSWDP TLLVPGLGLKKNQYLELYSNNSGPTIPRBLG	86
Consensus	n egdal l l d nrvlqswdptllvp lg lkn qylelysn g p lg	
MHSERK1	NLTSLVSLDLYLNSFTGPTIPDLSLCKLKRFLRLNNSLSLCP IPMSLTNITSSIQVLDLSNNRLSGVWPDNGSFLFTPI SFANNMLDLOGP	175
MHDSERK1	NLTSLVSLDLYLNSFTGPTIPDLSLCKLKRFLRLNNSLSLCP IPMSLTNITSSIQVLDLSNNRLSGVWPDNGSFLFTPI SFANNMLDLOGP	175
ATSERK1	NLTMVSLDLYLNSFTGPTIPDLSLCKLKRFLRLNNSLSLCP IPMSLTNITMILQVLDLSNNRLSGVWPDNGSFLFTPI SFANNMLDLOGP	177
RCSEK1	NLTSLVSLDLYLNSFTGPTIPDLSLCKLKRFLRLNNSLSLCP IPMSLTNITSSIQVLDLSNNRLSGVWPDNGSFLFTPI SFANNMLDLOGP	175
STSERK1	NLTMVSLDLYLNSFTGPTIPDLSLCKLKRFLRLNNSLSLCP IPMSLTNITSSIQVLDLSNNRLSGVWPDNGSFLFTPI SFANNMLDLOGP	178
ZMSERK1	NLTMVSLDLYLNSFTGPTIPDLSLCKLKRFLRLNNSLSLCP IPMSLTNITMILQVLDLSNNRLSGVWPDNGSFLFTPI SFANNMLDLOGP	173
ZMSERK2	NLTMVSLDLYLNSFTGPTIPDLSLCKLKRFLRLNNSLSLCP IPMSLTNITMILQVLDLSNNRLSGVWPDNGSFLFTPI SFANNMLDLOGP	176
Consensus	nlt lvsldly n f g ip lg l klrflrlnns sl cp ipms ltni tss i qvld lsn nrl sgv wpdngs flft pi sfann ml dlogp	
MHSERK1	VTGRPFCGSPPPSPPPPVPVPPPISTPG.NSATAAGAGVAAAGALFAAPATAFAWRRRRKPEFFDVPABEDPEVHLGQLKRFSLRE	264
MHDSERK1	VTGRPCPGSPPPSPPPPVPVPPPISTPGNSATGAIAGGVAAGAALFAAPATAFAWRRRRKPEFFDVPABEDPEVHLGQLKRFSLRE	265
ATSERK1	VTSRPCGSPPPSPPPPVPVPPPIVPTPGYSATGAIAGGVAAGAALFAAPATAFAWRRRRKPEFFDVPABEDPEVHLGQLKRFSLRE	267
RCSEK1	VTGRPCGSPPPSPPPPVPVPPPISTPGNSATGAIAGGVAAGAALFAAPATAFAWRRRRKPEFFDVPABEDPEVHLGQLKRFSLRE	265
STSERK1	VTGRPCGSPPPSPPPPVPVPPPISTPGNSATGAIAGGVAAGAALFAAPATAFAWRRRRKPEFFDVPABEDPEVHLGQLKRFSLRE	268
ZMSERK1	GTTGPCGAPPPSPPPPVPVPPPISTPGNSATGAIAGGVAAGAALFAAPATAFAWRRRRKPEFFDVPABEDPEVHLGQLKRFSLRE	262
ZMSERK2	GTSRCPGAPPPSPPPPVPVPPPISTPGNSATGAIAGGVAAGAALFAAPATAFAWRRRRKPEFFDVPABEDPEVHLGQLKRFSLRE	266
Consensus	t pcpg ppspppp pp tsga aggvaag al faapa afa wrrrrkpe ffdvpaedpevhlgqlk fsrle	
MHSERK1	LQVATDSFSNNILGRGGFGKVKYKRLADGSLVAVKRLKEERTPGCELQFQTEVENISMVHNNLRLRGCMTPTERLLVVPYMGANGSV	354
MHDSERK1	LQVATDSFSNNILGRGGFGKVKYKRLADGSLVAVKRLKEERTPGCELQFQTEVENISMVHNNLRLRGCMTPTERLLVVPYMGANGSV	355
ATSERK1	LQVATDSFSNNILGRGGFGKVKYKRLADGSLVAVKRLKEERTPGCELQFQTEVENISMVHNNLRLRGCMTPTERLLVVPYMGANGSV	357
RCSEK1	LQVATDSFSNNILGRGGFGKVKYKRLADGSLVAVKRLKEERTPGCELQFQTEVENISMVHNNLRLRGCMTPTERLLVVPYMGANGSV	355
STSERK1	LQVATDSFSNNILGRGGFGKVKYKRLADGSLVAVKRLKEERTPGCELQFQTEVENISMVHNNLRLRGCMTPTERLLVVPYMGANGSV	358
ZMSERK1	LQVATDSFSNNILGRGGFGKVKYKRLADGSLVAVKRLKEERTPGCELQFQTEVENISMVHNNLRLRGCMTPTERLLVVPYMGANGSV	352
ZMSERK2	LQVATDSFSNNILGRGGFGKVKYKRLADGSLVAVKRLKEERTPGCELQFQTEVENISMVHNNLRLRGCMTPTERLLVVPYMGANGSV	356
Consensus	lqvadt f n n lgrggfgkvykgr l d g slvavr lkeertpgcelqfqteve ismavh nllrlrgcmtpt erllvvpymangsv	
MHSERK1	ASCLRERPPNQPDPWPTTRKRIALGSARGLSYLHDHCDPKI IHRDVKAANI LLDBDFEAVVGDGFLAKLMDYKDTHTVTTAVRGTIGHIAP	444
MHDSERK1	ASCLRERPPNQPDPWPTTRKRIALGSARGLSYLHDHCDPKI IHRDVKAANI LLDBDFEAVVGDGFLAKLMDYKDTHTVTTAVRGTIGHIAP	445
ATSERK1	ASCLRERPPSOPPLAWSTRQGTALGSARGLSYLHDHCDPKI IHRDVKAANI LLDBDFEAVVGDGFLAKLMDYKDTHTVTTAVRGTIGHIAP	447
RCSEK1	ASCLRERPPSOPPLAWSTRKRIALGSARGLSYLHDHCDPKI IHRDVKAANI LLDBDFEAVVGDGFLAKLMDYKDTHTVTTAVRGTIGHIAP	445
STSERK1	ASCLRERPPSEPPPLWMPXRRKRIALGSARGLSYLHDHCDPKI IHRDVKAANI LLDBDFEAVVGDGFLAKLMDYKDTHTVTTAVRGTIGHIAP	448
ZMSERK1	ASRLRERAPNEPPLWMBTRARIALGSARGLSYLHDHCDPKI IHRDVKAANI LLDBDFEAVVGDGFLAKLMDYKDTHTVTTAVRGTIGHIAP	442
ZMSERK2	ASRLRERQSEPPPLWMBPRRRIALGSARGLSYLHDHCDPKI IHRDVKAANI LLDBDFEAVVGDGFLAKLMDYKDTHTVTTAVRGTIGHIAP	446
Consensus	as lrer p pl w r ialgsarglsylhdhcdpkiihrdvkaanilldbdfeavvgdflaklmdykdtthvttavrgtighiap	
MHSERK1	EYLSGTGKSSSEKTDVFGYGIIMLLELITGQRAFDLARLANDDDVMLLDWVKCLLKEKREBMLVDPDLQSNYVEAEVEQLIQVALLCTQSSPM	534
MHDSERK1	EYLSGTGKSSSEKTDVFGYGIIMLLELITGQRAFDLARLANDDDVMLLDWVKCLLKEKREBMLVDPDLQSNYVEAEVEQLIQVALLCTQSSPM	535
ATSERK1	EYLSGTGKSSSEKTDVFGYGIIMLLELITGQRAFDLARLANDDDVMLLDWVKCLLKEKREBMLVDPDLQSNYVEAEVEQLIQVALLCTQSSPM	537
RCSEK1	EYLSGTGKSSSEKTDVFGYGIIMLLELITGQRAFDLARLANDDDVMLLDWVKCLLKEKREBMLVDPDLQSNYVEAEVEQLIQVALLCTQSSPM	535
STSERK1	EYLSGTGKSSSEKTDVFGYGIIMLLELITGQRAFDLARLANDDDVMLLDWVKCLLKEKREBMLVDPDLQSNYVEAEVEQLIQVALLCTQSSPM	538
ZMSERK1	EYLSGTGKSSSEKTDVFGYGIIMLLELITGQRAFDLARLANDDDVMLLDWVKCLLKEKREBMLVDPDLQSNYVEAEVEQLIQVALLCTQSSPM	532
ZMSERK2	EYLSGTGKSSSEKTDVFGYGIIMLLELITGQRAFDLARLANDDDVMLLDWVKCLLKEKREBMLVDPDLQSNYVEAEVEVEQLIQVALLCTQSSPM	536
Consensus	eylstgkssektdvfgygimllelitgqrafdlarlandddvmlldwvkllek e lvdpdly eve liqvallctq p	
MHSERK1	DRPKMSEVWRLMELGDLAEKRWQVQVWVLRQVEVLAHPNSDWIWDSTNDLHANELSGP	594
MHDSERK1	DRPKMSEVWRLMELGDLAEKRWQVQVWVLRQVEVLAHPNSDWIWDSTNDLHANELSGP	595
ATSERK1	BRPKMSEVWRLMELGDLAEKRWQVQVWVLRQVEVLAHPNSDWIWDSTNDLHANELSGP	597
RCSEK1	DRPKMSEVWRLMELGDLAEKRWQVQVWVLRQVEVLAHPNSDWIWDSTNDLHANELSGP	598
STSERK1	DRPKMSEVWRLMELGDLAEKRWQVQVWVLRQVEVLAHPNSDWIWDSTNDLHANELSGP	595
ZMSERK1	BRPKMSEVWRLMELGDLAEKRWQVQVWVLRQVEVLAHPNSDWIWDSTNDLHANELSGP	591
ZMSERK2	DRPKMSEVWRLMELGDLAEKRWQVQVWVLRQVEVLAHPNSDWIWDSTNDLHANELSGP	595
Consensus	rpkmsev rml egdglae w wqkv v rqe e dw dst nl a elsgp	

C-terminal

图 2 MhSERK1、MhdSERK1 与其它 SERK 同源基因编码的氨基酸序列对比

3 结论和讨论

众多研究表明, *SERK* 同源基因广泛存在于双子叶植物、单子叶植物和裸子植物中, 组成了一个新的基因家族^[17]。关于 *SERK* 基因的结构, 研究得最清楚和最彻底的是 *AtSERK1*, 不同物种来源的 *SERK* 基因在结构上大多含有相似的内含子和外显子结构,

一般来说, *SERK* 基因由 11 个外显子和 10 个内含子组成; 这些区域中有 2 个 LRR 富亮氨酸重复序列结构域和 3 个蛋白激酶结构域。因此, 组成了植物受体类蛋白激酶家族中最大的亚家族 LRR-RLK^[19]; 富亮氨酸重复类受体蛋白激酶在植物的生殖过程中参与了体细胞胚胎发生^[20,10]、小孢子分化发育^[21,11-12]、细胞死亡调控^[22-23] 以及无融合生殖^[24]

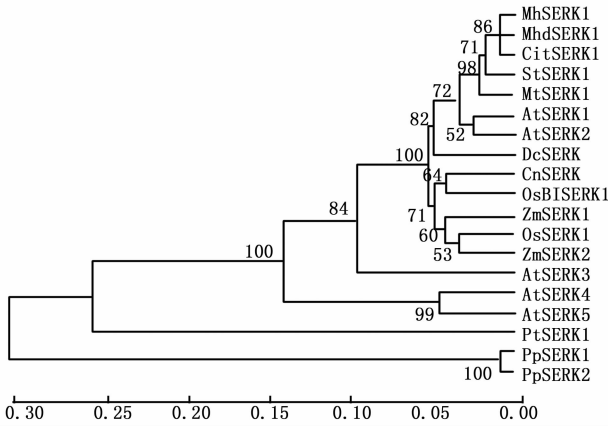


图3 *MhSERK1*、*MhdSERK1* 与其他 *SERK* 同源基因编码氨基酸的聚类分析

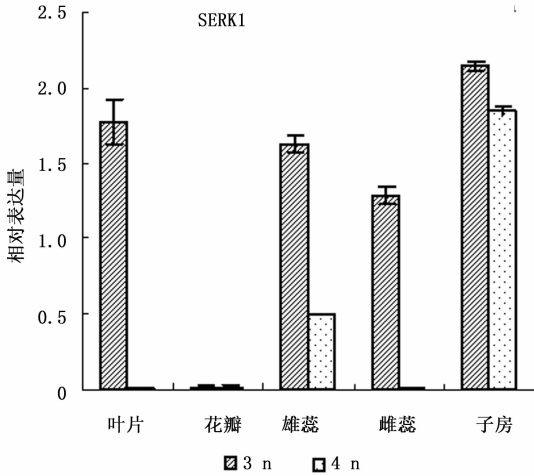


图4 *SERK1* 基因在平邑甜茶和杂种后代不同器官组织中的表达

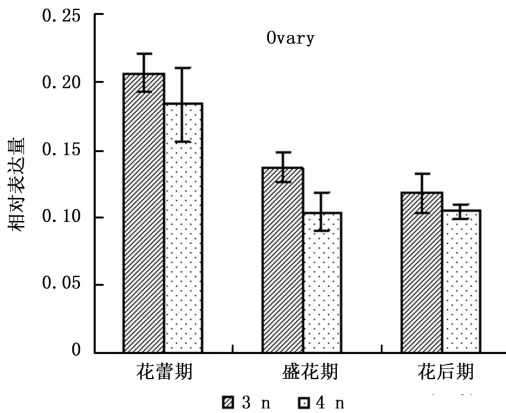


图5 *MhSERK1* 和 *MhdSERK1* 基因在花期的表达

SERK1 基因在核酸和蛋白质水平上都与其他 *SERK* 同源基因类似,都具有 1 个 SP 信号肽;1 个 ZIP 亮氨酸拉链;1 个 LRR 富亮氨酸重复序列;1 个 SPP 富脯氨酸结构域,1 个 TM 跨膜结构域;1 个 Kinase 激酶活性结构域和 C-端结构域;这一序列特征表明该 *MhSERK1* 和 *MhdSERK1* 基因可能与其他物种中的 *SERK* 同源基因类似,在平邑甜茶和杂种后代生殖发育过程中发挥着重要的调控作用。

实时定量结果表明,*MhSERK1* 和 *MhdSERK1* 基因主要是在生殖器官的子房中表达量最高,说明其在植物生殖过程中发挥着重要作用;在本研究中,根据 *SERK* 基因在子房发育不同时期的表达情况,可以推测在平邑甜茶和杂种后代中 *SERK1* 基因起到了一定的调控作用:*SERK1* 基因在平邑甜茶胚胎发育早期开始启动,在有性生殖过程中大孢子母细胞未进入减数分裂前,也就是在花蕾期时 *SERK* 基因的表达量是最高的;随着大孢子母细胞的发育在进入四分体时期前由于 *SERK* 基因的调控而终止了减数分裂进程,而这个时期正好是盛花期,相对的 *SERK* 基因表达量也有所降低;此时,控制无融合生殖的基因开始发挥作用,行无融合生殖方式,在花期后的子房中 *SERK* 基因的表达量继续降低,因此,说明平邑甜茶具有较高的无融合生殖能力。而在杂种后代株系中控制有性生殖的 *SERK* 基因在大孢子母细胞发育时期也就是花蕾期时没有启动,使得有性生殖过程得以正常进行,表现为有性生殖过程占绝对优势,*SERK* 基因的表达量相对较低,在杂种后代株系中随着大孢子母细胞的发育进入减数分裂(盛花期),完成了双受精过程,所以 *SERK* 基因在花期后子房的表达量达到最高,这可能就是后代无融合生殖能力降低的主要原因。

参考文献:

- [1] 束怀瑞. 苹果学[M]. 北京:中国农业出版社,1999,210-235.
- [2] 李光杰. 平邑甜茶 *SnRK1* 基因的克隆、表达及其功能的研究[D]. 泰安:山东农业大学,2009.
- [3] 史兴征. 平邑甜茶 *GLB1* 基因的克隆、表达及其功能的研究[D]. 泰安:山东农业大学,2010.
- [4] 张雨杰,苹果属无融合生殖相关 *SERK* 基因克隆与表达分析及遗传转化的研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2013.
- [5] Schmidt H. Contribution on the Breeding of Apomictic Apple Stocks 4. On the Inheritance of Apomixis[J]. Z Pflanzenzuchtg. 1977,78: 312.

过程,并发挥了重要的调控功能。本研究表明,从平邑甜茶和杂种后代中分离得到的 *MhSERK1* 和 *Mhd-*

- [6] 林盛华, 刘捍中, 蒲富慎. 苹果属植物不同倍性的杂种后代染色体数目观察[J]. 中国果树, 1989, (4): 15 - 16.
- [7] 王颖, 商月惠, 王玉霞, 等. 平邑甜茶与扎矮山定子杂交后代的胚胎发育特征研究[J]. 园艺学报, 2008, 35(8): 1093 - 1100.
- [8] 王颖. 平邑甜茶(*Malus hupehensis* var. *pingyiensis*)的杂交后代生殖特性研究和花期子房抑制性消减文库构建[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2009.
- [9] 林庆光, 崔百明, 彭明. SERK 基因家族的研究进展[J]. 遗传, 2007, 29(6): 681 - 687.
- [10] 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.
- [11] Albrecht C, Russinova E, Hecht V, et al. The Arabidopsis thaliana SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1 and 2 control male sporogenesis[J]. Plant Cell, 2005, 17(12): 3337 - 3349.
- [12] Colcombet J, Boisson-Dernier A, Ros-Palau R, et al. Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES1 and 2 are essential for tapetum development and microspore maturation[J]. Plant Cell, 2005, 17(12): 3350 - 3361.
- [13] Hecht V, Vielle-Calzada J P, Hartog M V, et al. The Arabidopsis somatic embryogenesis receptor kinase I gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture[J]. Plant Physiol, 2001, 127(3): 803 - 816.
- [14] 石雅丽, 张锐, 林芹, 等. 植物体细胞胚胎发生受体类蛋白激酶的生物学功能[J]. 遗传, 2012, 34(5): 551 - 559.
- [15] 邹冬梅, 刘月学, 张志宏, 等. 草莓 *API* 同源基因的克隆与表达分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(10): 1972 - 1981.
- [16] Jun Ma, Yehua He, Chenghou Wu, et al. Cloning and molecular characterization of a SERK gene transcriptionally induced during somatic embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan [J]. Plant Mol Biol Rep, 2012, 30: 195 - 203.
- [17] Santos M D O, 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 Sci, 2005, 168(3): 723 - 729.
- [18] Hecht V, Vielle-Calzada J P, Hartog M V, et al. The Arabidopsis somatic embryogenesis receptor kinase1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture[J]. Plant Physiol, 2001, 127: 803 - 816.
- [19] 陈小飞, 萧浪涛, 鲁旭东, 等. 体细胞胚胎发生相关类受体蛋白激酶基因(*SERK*)的研究进展[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(5): 570 - 577.
- [20] 石雅丽. 棉花体细胞胚发生受体类激酶基因的克隆与功能分析[D]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2011.
- [21] Zhao D Z, Wang G F, Speal B, et al. The EXCESS MICROSPOROCTES1 gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the Arabidopsis anther [J]. Genes Dev, 2002, 16(15): 2021 - 2031.
- [22] Kemmerling B, Schwedt A, Rodriguez P, et al. Isolation and characterization of four somatic embryogenesis receptor-like kinase (Rh-SERK) genes from miniature potted rose (*Rosa hybrida* cv. Linda) [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2010, 101(3): 331 - 338.
- [23] He K, Gou X P, Yuan T, et al. BAK1 and BKK1 regulate brassinosteroid - dependent growth and brassinosteroid-independent cell - death pathways[J]. Curr Biol, 2007, 17(13): 1109 - 1115.
- [24] Emidio A, Gianpiero M, Gianni Ba, et al. Isolation of candidate genes for apomixis in *Poa pratensis* L [J]. Plant Molecular Biology, 2004, 56: 879 - 894.

(责任编辑: 彭南轩)