

铁皮石斛体细胞胚胎发生类受体激酶基因*DoSERK*的克隆和表达分析

王晓娟^{1,2}, 张建霞¹, 何春梅^{1,2}, 曾宋君¹, 吴坤林¹, 段俊^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 中国科学院华南农业植物分子分析与遗传改良重点实验室, 广州 510650; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为了解铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)中的体细胞胚胎发生类受体激酶基因 *DoSERK* 的功能, 在转录组测序数据的基础上克隆了 *DoSERK* 的全长 cDNA。结果表明, *DoSERK* 与其他植物的 *SERK* 高度同源, 编码 633 个氨基酸。生物信息学分析表明, *DoSERK* 蛋白为亲水蛋白并定位于质膜, 具有 1 个信号肽、1 个富脯氨酸区域、1 个跨膜区、5 个富亮氨酸重复序列以及 1 个保守的蛋白激酶活性结构域, 属于 *SERK* 蛋白家族成员。系统进化树分析表明, *DoSERK* 与同为兰科植物的文心兰(*Cyrtorchilus loxense*)以及卡特兰(*Cattleya maxima*)的 *SERK* 亲缘关系最近。组织表达分析表明, *DoSERK* 在铁皮石斛中广泛表达, 以幼嫩小苗根部的表达量最高。这些说明 *DoSERK* 除了可能参与铁皮石斛体胚发生过程以外, 还参与其他生长发育过程。

关键词: 铁皮石斛; 体细胞胚胎; *SERK*; 基因表达

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.05.006

Cloning and Expression Analysis of Somatic Embryogenesis Receptor Kinase Gene (*DoSERK*) from *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

WANG Xiao-juan^{1,2}, ZAHNG Jian-xia¹, HE Chun-mei^{1,2}, ZENG Song-jun¹, WU Kun-lin¹, DUAN Jun^{1*}

(1. Key Laboratory of South China Agricultural Plant Molecular Analysis and Genetic Improvement, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 501650, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In order to understand the function of somatic embryogenesis receptor-like kinase gene (*DoSERK*) from *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, the full-length cDNA of *DoSERK* was cloned based on transcription sequences data. The results showed that *DoSERK* had high homology to *SERK* gene in other plants, encoding 633 amino acids. Bioinformatics analysis showed that *DoSERK* was a hydrophilic protein locating in plasma membrane. *DoSERK* had typical domains of *SERK* proteins, containing one signal peptide, one specific proline-rich region, five leucine-rich repeat motifs, one transmembrane domain and one conservative protein kinase domain. Phylogenetic tree based on *SERK*s revealed that *D. officinale* was close to *Cyrtorchilus loxense* and *Cattleya maxima* of Orchidaceae. *DoSERK* could widely express in tissues of *D. officinale*, and the expression was high in roots of seedlings. So, it was suggested that *DoSERK* not only involved in somatic embryogenesis, but also in many other processes of growth and development.

Key words: *Dendrobium officinale*; Somatic embryogenesis; *DoSERK*; Gene expression

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)是我国传统的名贵中药材。为解决铁皮石斛野生

资源日渐稀缺, 自然条件下繁殖率低等问题, 对铁皮石斛的快繁体系建立进行了大量的研究^[1]。通过

收稿日期: 2014-11-17

接受日期: 2015-01-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370365); 国家农业科技成果转化资金项目(2013GB24910676); 广东省科技计划项目(2012A020602100); 广西科技计划项目(桂科转 14125003-2-29)资助

作者简介: 王晓娟, 女, 硕士。E-mail: wangxiaojuan1202@126.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: duanj@scib.ac.cn

诱导外植体产生体细胞胚,进而发育成类原球茎的体胚发生方式,是铁皮石斛重要的再生繁殖途径之一,这对于解决具优良性状母本植株的无性快繁和种质资源保存具有重要意义。类原球茎的形成是铁皮石斛组培体系中普遍而又关键的环节,类原球茎的形成过程也就是体胚发生的过程。体胚发生过程不仅仅涉及到复杂的生理生化水平的改变,更有众多差异基因的表达和各种信号转导途径^[2]。对体胚发生的分子调控机制的研究,一直是现代分子植物学的研究热点,目前已验证出很多体细胞胚胎发生的相关基因,如 *SERK* (Somatic embryogenesis receptor-like kinase)、*AGL15* (Agamous-like 15)、*BBM* (Baby boom)、*LEC2* (Leafy cotylenon 2)和 *WUS* (Wuschel)等基因,体胚发生的基因调控网络得到了初步的建立^[3-4]。在植物体细胞胚胎发生的过程中,膜富亮氨酸重复序列类受体蛋白激酶 (Leucine-rich repeat receptor-like kinase, LRR-RLK) 基因对细胞内外的信号转导起着重要的作用^[5],而 *SERK* 基因作为 *LRR-RLK* 基因家族的成员之一,已有大量研究表明 *SERK* 基因在体细胞胚胎发生过程特异表达,并且可以作为体细胞胚胎发生的标记基因^[6],同时也可以作为体细胞具体胚发生能力的体现^[7]。自 *SERK* 首次从胡萝卜 (*Daucus carrot*) 胚性愈伤组织中分离后^[6],又从拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[8]、水稻 (*Oryza sativa*)^[9] 等植物中分离得到,证实 *SERK* 广泛存在于植物界中。*SERK* 是以基因家族形式存在的, *SERK* 基因除参与植物体胚发生过程的信号转导外,在激素应答、病害防御、孢子体发育等方面也发挥着重要作用^[10-11]。

目前关于铁皮石斛体细胞胚胎发生途径的再生繁殖技术已开展了大量研究^[12-15],而对于调控体胚发生的关键基因的研究报道较少,铁皮石斛体胚发生的调控网络尚不明确,且 *SERK* 基因除在兰科植物文心兰 (*Cyrtorchilum loxense*)^[16] 和卡特兰 (*Cattleya maxima*)^[17] 中克隆外,还尚未从石斛属植物中克隆。采用分子生物学手段研究铁皮石斛的体细胞胚胎发生过程,克隆关键基因,将有助于阐明铁皮石斛体胚发生的分子机制以及提高其体胚发生的诱导率。本文在转录组测序数据的基础上,克隆了组培铁皮石斛 *SERK* 基因的全长 cDNA,并采用生物信息学分析预测 *SERK* 的理化性质、结构特征和功能;同时采用实时定量 PCR 技术分析 *SERK* 基因在不同发育时期和不同组织器官的表

达,为研究 *SERK* 基因在铁皮石斛体胚发生过程中的分子机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 为本实验室培养保存。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 为本实验室保存, pMD18-T 载体、LA Taq DNA 聚合酶、dNTP、DNA Marker、荧光定量 PCR 试剂盒 KAPA SYBR FAST 均购自于 TaKaRa 公司,实验所用引物均为深圳华大基因公司合成。

1.2 总RNA的提取

采用 2 $\times$ CTAB 法^[18]分别提取铁皮石斛原球茎、类原球茎团、丛生芽以及小苗的根、茎、叶等组织部位的总 RNA,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整度,并用核酸仪测定其浓度和纯度。

1.3 *SERK*基因的同源克隆

核心片段的获得 对本课题组前期的铁皮石斛转录组测序数据分析,共得到 12 条注释为 *SERK* 基因的 unigene,通过 BLAST 同源搜索,选取同源性和相似性最高的 unigene 为目的基因的核心片段。该目的片段长度为 694 bp。

3' 和 5' 端序列的扩增 采用 RACE PCR 方法,首先按照 Clontech 的 SMARTerTM RACE cDNA Amplification 试剂盒说明书进行 3' RACE 和 5' RACE cDNA 模板的制备,再根据核心片段分别设计 3' RACE 引物 (SF1: 5'-GCCAGAGTATTTATCAACAG-3', SR1: 5'-AAATGTTCTTGTGGCTTCCGACGA-3') 和 5' RACE 引物 (SF2: 5'-AATGATGATGATGTTCATGCTAC-3', SR2: 5'-CACCGGTGCTTGAGGCACTATTTC-3')。使用 LA Taq DNA 聚合酶扩增 *SERK* 基因的 3' 和 5' 末端序列。3' RACE PCR 的第一轮扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 然后 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。第二轮扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 然后 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。5' 末端序列同样采用两步法 PCR 扩增,第一轮和第二轮的扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 然后 98 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 68 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 共 35 个循环;

最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离后回收纯化, 连接到 pMD18-T 载体中, 然后采用热激法转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 对单克隆菌落进行 PCR 鉴定, 选取阳性克隆送至深圳华大基因有限公司测序。

SERK 基因序列的拼接 利用拼接软件将得到的 *SERK* 基因 3'、5' 末端序列和核心片段进行拼接, 获得铁皮石斛 *SERK* 的全长 cDNA。

1.4 生物信息学分析

采用 NCBI 网站上的 BLAST 程序进行序列同源性分析和相似性搜索。利用 DNASTar 和 NCBI 的 ORF finder 工具进行蛋白质的基本理化参数分析。利用 ExPASy、PreditProtein 网站上的在线软件进行蛋白质的亲疏水性分析、二级结构和三级结构预测。利用 COILS 在线软件对蛋白质进行卷曲螺旋结构预测。利用 NCBI-CDS 以及 Motif Scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) 在线程序进行保守结构域的分析。利用在线工具 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>、<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/> 和 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/> 等分别进行信号肽、亚细胞定位和核输出信号的预测。用在线软件 NetPhos 2.0 Serve 进行蛋白质的磷酸化位点预测。采用 DNAMAN 软件进行多重序列比对, 以及 Clustalx 软件和 MEGA 5.0 软件构建进化树。

1.5 SERK 的组织表达分析

SERK 的组织表达采用荧光定量 PCR 检测。荧光定量反应体系及程序参照 KAPA SYBR FAST

qPCR 说明书, 在 ABI 7500 Real-time PCR 仪上进行。引物分别为 qSERK-F: 5'-GAGAACGGCAAC-CAAATGAAC-3' 和 qSERK-R: 5'-CAGTGGTCATGCAGGTAAGAA-3'; 反应体系为 10 μ L, 包含 5 μ L 的 2 $\times$ KAPA SYBR FAST qPCR MasterMix2 Universal, 正反向引物各 0.2 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 50 $\times$ ROX High/Low 0.2 μ L, 反应程序为 95℃ 预变性 3 min; 然后 95℃ 变性 3 s, 60℃ 退火/延伸 34 s, 共 40 个循环。以铁皮石斛的 *Actin* 基因作为内参。扩增 *Actin* 基因的引物分别为 qACT-F: 5'-TGTTAGCCATACAGTTCCT-3' 和 qACT-R: 5'-TGTTAGCCATACAGTTCCT-3'。

2 结果和分析

2.1 SERK 基因全长 cDNA 的获得

通过对铁皮石斛 *SERK* 基因 cDNA 进行两次巢式 PCR 扩增, 分别得到 1565 bp 的 3' 端序列和 962 bp 的 5' 端序列, 分别与核心片段有 162 bp 和 255 bp 的重叠。在 NCBI 中使用 BLAST 程序对序列进行同源性分析表明, 其与其他物种的 *SERK* 具有很高的同源性, 因而确定为目的核心片段的 3' 和 5' 端序列。通过拼接得到铁皮石斛 *SERK* 基因的全长 cDNA, 长度为 2465 bp, 采用 DNASTar 的 ORF finder 工具查找到 *SERK* 基因的 ORF 长度为 1902 bp, 将该基因命名为 *DoSERK*, 在 NCBI 的登录号为 KP009862。

2.2 生物信息学分析

DoSERK 蛋白的同源性 经 BLAST 搜索和分析, *DoSERK* 基因编码的氨基酸序列与

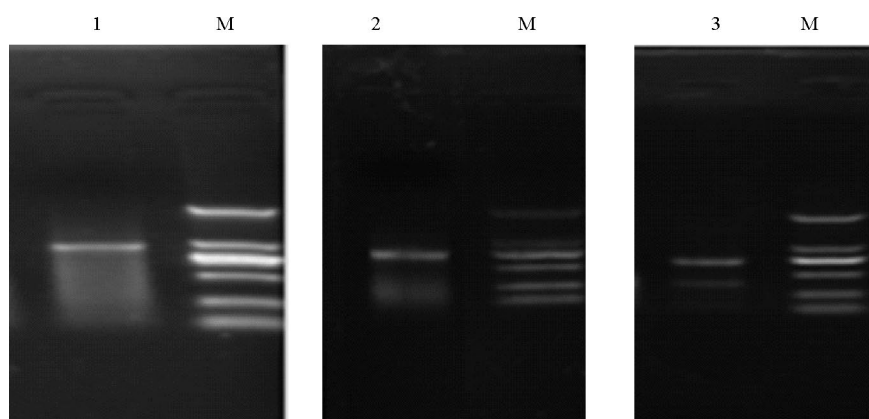


图 1 铁皮石斛 *SERK* 基因的 PCR 扩增。M: 2000 kb DNA marker; 1: 第一次 3' RACE; 2: 第二次 3' RACE; 3: 5' RACE。

Fig. 1 PCR amplification of *DoSERK*. M: 2000 kb DNA marker; 1: 1st time of 3' RACE; 2: 2nd time of 3' RACE; 3: 5' RACE.

其他物种的 SERK 表现出高度的同源性,与菠萝(*Ananas comosus*, AEC46975.1)、水稻(*Oryza sativa*, AAR26543.1)、野生稻(*O. rufipogon*, XP_006659883.1)、短柄草(*Brachypodium sylvaticum*, XP_003571417.1)、文心兰(CBV98085.1)、小米(*Setaria italica*, XP_004972726.1)、葡萄(*Vitis vinifera*, XP_002276414.2)和牡丹(*Paeonia suffruticosa*, XP_004952868.1)的 SERK 分别为 93%、90%、92%、90%、92%、90%、89% 和 89%。这说明克隆的 *DoSERK* 基因与 *SERK* 同源。

蛋白质的理化性质 *DoSERK* 的 ORF 长度为 1902 bp, 编码 633 个氨基酸, *DoSERK* 蛋白的分子量为 69.7 kDa, 分子式为 $C_{3103}H_{4905}N_{863}O_{922}S_{21}$, 原子数为 9814 个, 理论等电点为 5.55, 含有 58 个酸性氨基酸(K、R)和 72 个碱性氨基酸(D、E); 不稳定系数为 43.65(大于 40), 脂溶指数为 95.31, 总平均亲水性 GRAVY 值为 -0.151。因此, 推测 *DoSERK* 是一个亲水性蛋白。

蛋白质的亲疏水区域 利用 ExPASy 网站在

线软件(<http://web.expasy.org/protscale/>)分析 *DoSERK* 蛋白的亲疏水区域。结果表明, 在 *DoSERK* 蛋白的 C 端、N 端以及中间区域有多个较强的亲水性区域, 同时在相应位置也有多个较强的疏水性区域 (图 2)。这为判断蛋白质折叠的大致趋势提供了一个参考。

DoSERK 蛋白的保守结构域 根据 NCBI-CDS 在线分析表明, *DoSERK* 蛋白属于蛋白激酶超级家族, 含有 1 个蛋白激酶活性区域以及亮氨酸重复序列(LRR)区域, 因而同时属于亮氨酸重复序列超基因家族。Motif Scan 在线程序预测结果表明该蛋白包含有 1 个蛋白激酶活性结构域(第 310~590 位), 其中有 1 个蛋白激酶 ATP 结合位点(第 316~338 位)、1 个丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶激活位点(第 433~445 位)、1 个富脯氨酸区域(第 206~232 位)、1 个亮氨酸重复序列 N 末端区域 LRRNT_2 (第 33~73 位)、4 个亮氨酸重复序列 LRR_1 (第 101~123、125~147、149~171、173~194 位) (图 3)。

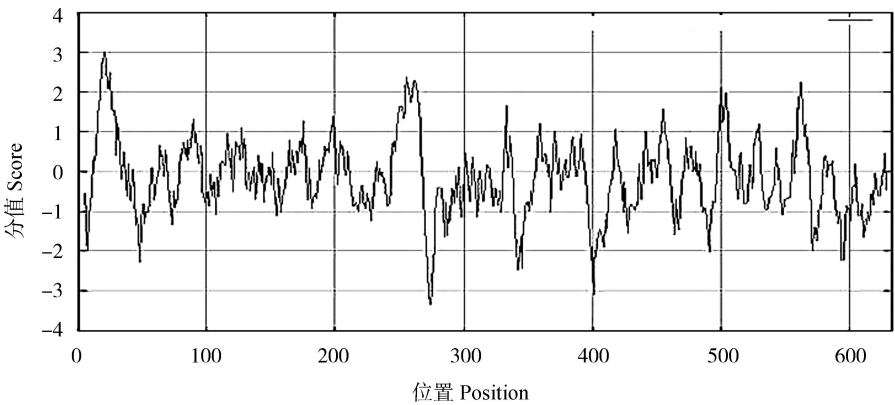


图 2 *DoSERK* 蛋白的亲疏水区域

Fig. 2 Hydrophilic area of *DoSERK*

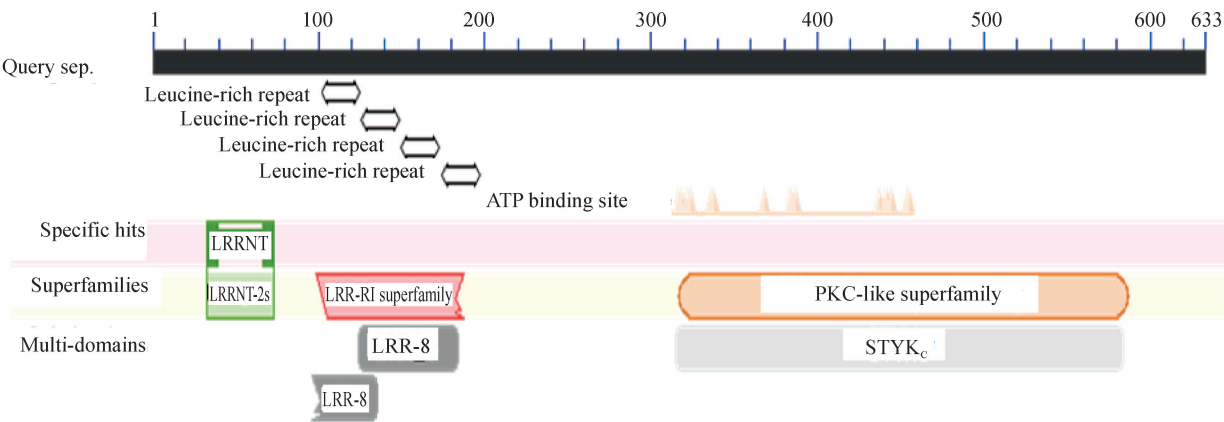


图 3 *DoSERK* 蛋白氨基酸序列的保守结构域

Fig. 3 Conserved domains of amino acid sequence of *DoSERK*

蛋白质的二级结构预测 利用 PreditProtein 网站预测铁皮石斛 DoSERK 蛋白的二级结构(图 4),可见 DoSERK 具有 20 个蛋白质结合位点,4 个 DNA 结合位点,二级结构中螺旋占 21.64%,折叠占 15.80%,转角占 62.56%。第 254~271 个氨基酸之间为 1 个可能的跨膜区域,无序区域较短,说明 DoSERK 可能为一个跨膜蛋白。

蛋白质的三级结构预测 使用 SWISS-MODEL 在线软件预测铁皮石斛 DoSERK 蛋白的三级结构。DoSERK 蛋白胞内区(第 294~597 位)的蛋白激酶活性中心由大量的 α 螺旋和无规则卷曲等组成,另外有 2 个明显连续的 α 螺旋近似处于同一个平面,还有 1 个 α 螺旋近似垂直于此平面(图 5: A)。胞外区(第 34~210 位)可见信号肽部位为 1 个明显的 α 螺旋结构,其他部位多为无规则卷曲组成(图 5: B)。

蛋白质的卷曲结构预测 运用 COILS 在线程序对 DoSERK 蛋白进行卷曲结构的预测,结果表明,在 window = 14、21 和 28 时形成卷曲螺旋的概率很低,表明 DoSERK 蛋白可能无法形成卷曲螺旋结构。

DoSERK 的亚细胞定位、信号肽以及核输出信

号预测 利用 PreditProtein 网站的亚细胞定位预测结果表明,DoSERK 可能定位于细胞膜上。利用 SignalP 和 NetNES 进行的信号肽和核输出信号预测结果表明,DoSERK 可能具有信号肽,属于分泌蛋白,在第 33 和 34 个氨基酸间有剪切位点;且在第 131 和 133 位氨基酸残基处具有核输出信号,因而可能具有核质穿梭的功能。

DoSERK 蛋白磷酸化位点预测 用 NetPhos 2.0 Serve 在线软件预测,结果表明 DoSERK 的磷酸化位点有 21 个,其中丝氨酸(Ser)有可能发生磷酸化的有 13 个,分别在肽链上的第 8、42、224、237、241、244、299、311、423、486、490、491、570 位;苏氨酸(Thr)有可能发生磷酸化的有 5 个,在肽链上的第 345、354、376、378、467 位;酪氨酸(Tyr)有可能发生磷酸化的有 3 个,分别在肽链上的第 104、108 和 484 位。

2.3 氨基酸序列多重比对和进化树的构建

根据 NCBI 序列比对结果,下载菠萝 (*Ananas comosus*)、水稻 (*Oryza sativa*)、小米(*Setaria italic*)、玉米(*Zea mays*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、文心兰、马尾松(*Pinus massoniana*)、大豆(*Glycine*

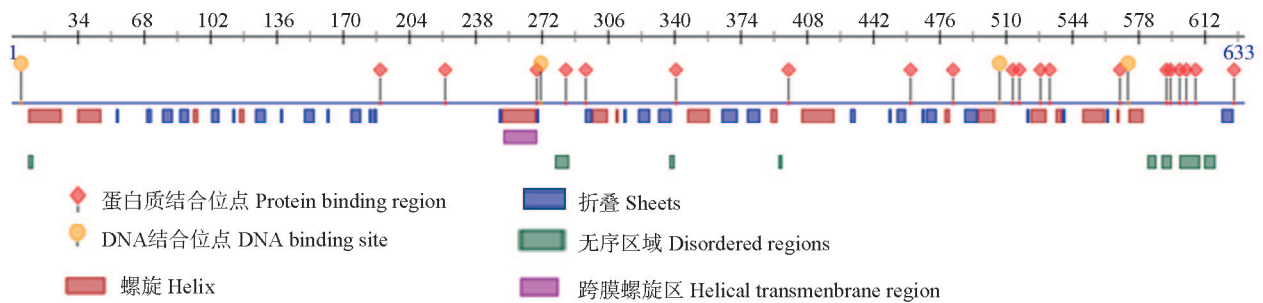


图 4 DoSERK 蛋白质的二级结构

Fig. 4 Secondary structure of DoSERK

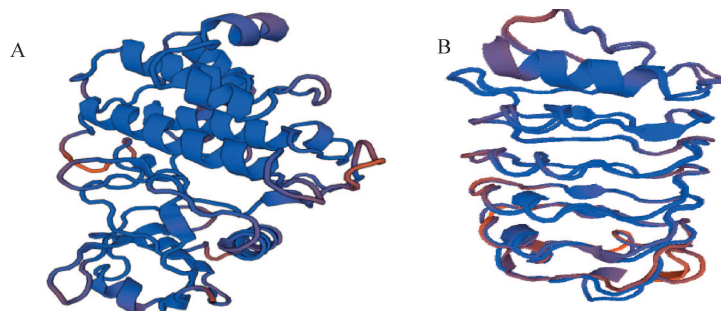


图 5 DoSERK 蛋白质的三级结构。A: 蛋白激酶活性中心;B: 胞外区。

Fig. 5 3D structure of DoSERK. A: Protein kinase activity area; B: Extracellular region.

max)、葡萄等物种 SERK 蛋白的氨基酸序列,采用 DNAMAN 软件进行序列多重比对。从图 6 可见,DoSERK 与这些物种 SERK 的氨基酸序列具有较高的同源性以及类似的结构特征,相似性均大于 89%。这说明 DoSERK 为 SERK 家族成员之一。

为进一步分析 DoSERK 的系统进化关系,使用 Clustalx 和 MEGA5.0 软件,采用邻位相连法(Neighbor-joining, NJ)构建系统进化树的。从图 7 可见, SERK 蛋白大致可分为单子叶植物和双子

叶植物两个分支,铁皮石斛的 SERK 蛋白与同科植物文心兰和卡特兰的亲缘关系最近,聚为一类并位于单子叶植物分支中,说明 SERK 蛋白在进化上具有种属特异性。

2.4 组织表达分析

对铁皮石斛组培小苗的根、茎、叶等器官和原球茎、类原球茎团、类原球茎分化的丛生芽中 DoSERK 基因进行实时荧光定量 PCR 检测。从图

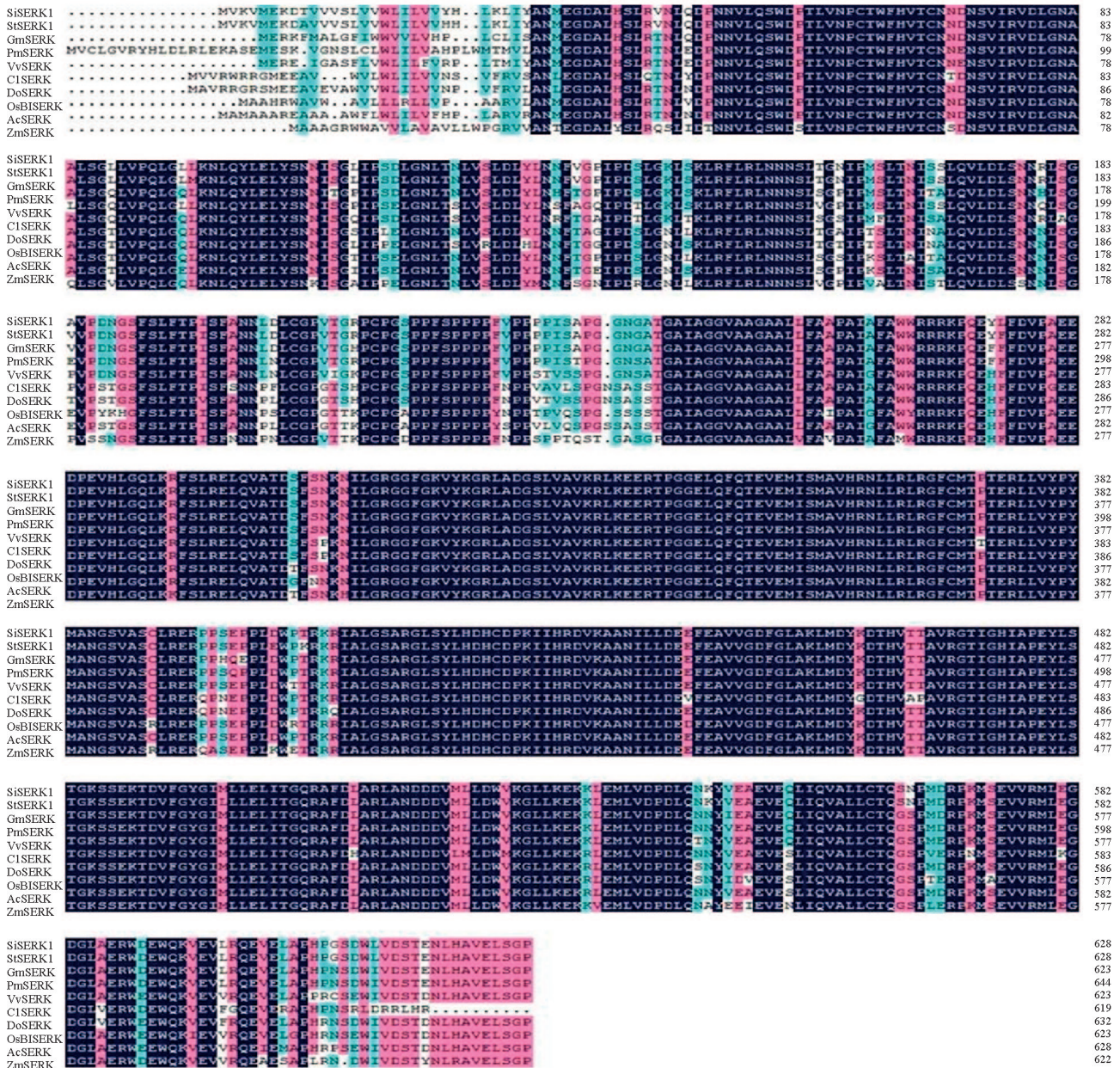


图6 DoSERK的氨基酸序列与其他物种SERK的多重比对。SiSERK1: 小米; SiSERK1: 马铃薯; GmSERK: 大豆; PmSERK: 马尾松; VvSERK: 葡萄; C1SERK: 文心兰; DoSERK: 铁皮石斛; OsB1SERK: 水稻; AcSERK: 菠萝; ZmSERK: 玉米。

Fig. 6 Aglinment of amino acid sequences of DoSERK with those of SERK in other plants. SiSERK1: *Setaria italic*; SiSERK1: *Solanum tuberosum*; GmSERK: *Glycine max*; PmSERK: *Pinus massoniana*; VvSERK: *Vitis vinifera*; C1SERK: *Cyrtochilum loxense*; DoSERK: *Dendrobium officinale*; OsB1SERK: *Oryza sativa*; AcSERK: *Ananas comosus*; ZmSERK: *Zea mays*.

8 可见, *DoSERK* 基因在组培小苗根中的表达量最高, 约是茎和叶中的 10 倍; 原球茎中的 *DoSERK* 基因的表达量较高, 而在类原球茎团和丛生芽中的表达量差异不大。

3 讨论

本研究在铁皮石斛转录组数据的基础上利用 RACE-PCR 方法分离出 *SERK* 家族中的 1 个基因,

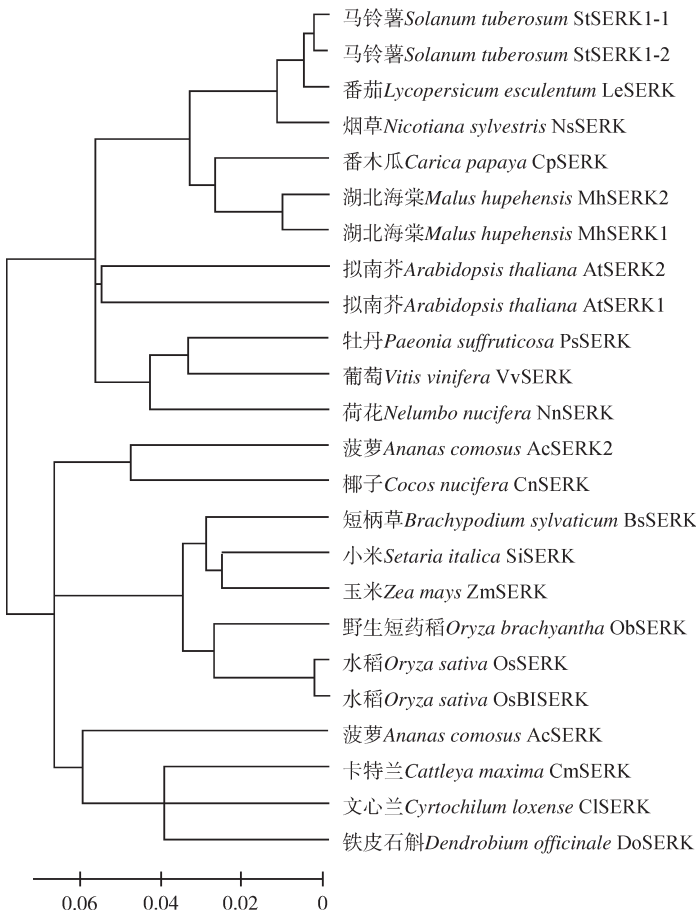


图 7 SERK 蛋白的系统进化树
Fig. 7 Phylogenetic tree of SERK proteins

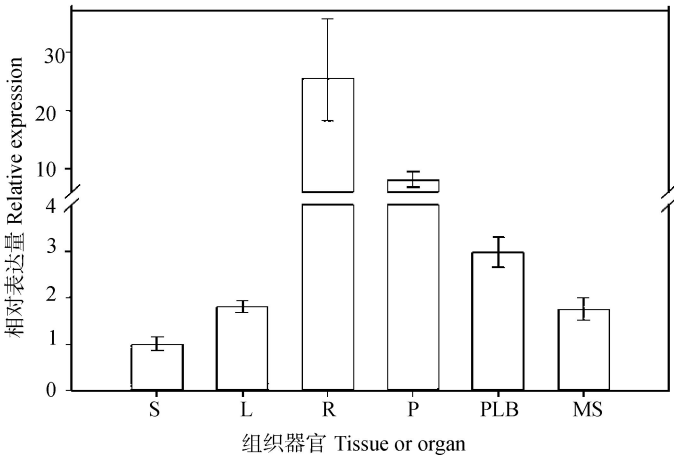


图 8 *DoSERK* 基因在不同组织器官中的表达。Actin 为内参基因; S: 茎; L: 叶; R: 根; P: 原球茎; PLB: 类原球茎; MS: 丛生芽。
Fig. 8 Expression of *DoSERK* in different tissues or organs. Actin was used as reference gene; S: Stem; L: Leaf; R: Root; P: Protocorm; PLB: Protocorm-like-body; MS: Multiple shoots.

通过同源性分析和多重序列比对表明:该基因编码的 DoSERK 蛋白与其它植物的 SERK 蛋白有很高的同源性,且具有 SERK 蛋白家族成员共同的保守结构域,包括 1 个信号肽、1 个跨膜区域、1 个富脯氨酸结构域、5 个亮氨酸重复序列和 1 个蛋白激酶活性结构域等,因而具有 SERK 蛋白家族的典型结构特征。SERK 蛋白家族的激酶结构域保守性最高,而信号肽序列的保守性最低(图 3)。DoSERK 蛋白的氨基酸组成、分子量及 PI 与高燕等^[19]、李龙等^[20]的研究结果相似,说明不同植物的 SERK 蛋白具有相似的一级结构和理化性质,推测他们在植物的生长发育过程中有着相似的功能。二级结构预测表明在第 33 和 34 位氨基酸残基之间具有信号肽的切割位点,推测其为分泌蛋白,具跨膜结构,定位于细胞膜上,这与 SERK 基因参与信号转导的功能相一致。通过生物信息学软件预测该基因编码蛋白的结构、功能、定位等,为进一步研究 DoSERK 基因的作用机制奠定了基础。

不同植物的 SERK 基因有着特定的表达模式。胡萝卜的 DcSERK 基因只在胚性细胞和体胚发生过程中的球形胚之前表达;而在非胚性细胞及球形期后的体细胞胚中均不表达,因而其被认为是体细胞胚发生过程中过渡性表达的特异基因^[6]。拟南芥的 AtSERK1 基因不仅在早期的合子胚及培养的胚性细胞中大量表达,还在雌配子体、孢子体原基周围细胞层、表皮细胞及成熟的根、茎、叶维管组织中少量表达,表明 AtSERK 基因不仅在体胚发生的诱导或维持中起重要作用,还可能广泛地参与植物生长发育的其它生物学过程^[7]。铁皮石斛的 DoSERK 在组织中广泛表达,即在萌发的原球茎,幼嫩的根、茎、叶,以及在类原球茎团,类原球茎分化的丛生芽中均有表达,说明这些组织的细胞可能均具备体细胞胚胎发生的能力。章婷婷等^[21]报道大蕉 SERK 基因在根、假茎、叶、果皮和花序中都有表达,且在花序中的表达量特别高。目前关于利用茎尖、合子胚、假茎、叶鞘等外植体诱导胚性愈伤组织的报道较多,且花序是诱导胚性组织的最理想外植体,说明 SERK 基因在体细胞胚胎发生中具有重要作用。因此,铁皮石斛的各组织部位以及各种培养物也都可以作为诱导体细胞胚胎发生的材料。另外 Kim 等^[22]曾报道拟南芥 LRR-RLK 家族成员 BARK1 基因在 BR 介导的根发育过程中起着重要作用, Nolan 等^[23]也报道蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)

MtSERK1 的表达与根的形成有关。作为 SERK 基因家族成员之一, DoSERK 在根中相对高表达说明其可能在根的形态建成和发育中也发挥一定的作用。

总之, SERK 基因的克隆为研究该基因在铁皮石斛体胚发生过程中的作用奠定基础,对深入了解铁皮石斛体胚发生的分子机制,提高铁皮石斛体胚发生的效率也具有重要意义。

参考文献

- [1] Huang Y. Research progress of tissue culture of *Dendrobium officinale* [J]. J Wenshan Univ, 2013, 26(6): 14–19.
黄勇. 铁皮石斛组织培养技术研究进展 [J]. 文山学院学报, 2013, 26(6): 14–19.
- [2] de Vries S. Signals and their transduction in early plant embryogenesis [M]// Altman A, Ziv M, Izhar S. Plant Biotechnology and *in vitro* Biology in the 21st Century. Netherlands: Springer, 1999: 373–382.
- [3] Elhiti M, Stasolla C, Wang A. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis [J]. *In vitro* Cell Dev Plant, 2013, 49(6): 631–642.
- [4] Suprasanna P, Bapat V A. Differential gene expression during somatic embryogenesis [M]// Mujib A, Šamaj J. Somatic Embryogenesis. Berlin Heidelberg: Springer, 2006: 305–320.
- [5] Torii K U. Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: Structure, function, and signal transduction pathways [J]. *Inter Rev Cytol*, 2004, 234: 1–46.
- [6] 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.
- [7] 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 Physiol*, 2001, 127(3): 803–816.
- [8] Salaj J, von Recklinghausen I R, Hecht V, et al. AtSERK1 expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2008, 46(7): 709–714.
- [9] 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.
- [10] Lin Q G, Cui B M, Peng M. Advanced study on SERK genes family [J]. *Hereditas*, 2007, 29(6): 681–687.
- [11] Chen X F, Xiao L T, Lu X D, et al. Progress in studies on somatic embryogenesis receptor-like kinase gene (SERK) [J]. *Plant Physiol Commun*, 2005, 41(5): 570–576.
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): 570–576.
- [12] Zhao P, Wu F, Feng F S, et al. Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. [J]. *In vitro* Cell Dev Plant, 2008, 44(3): 178–185.
- [13] Chang M H, Jin Y Z, Wang L. Rapid propagation technique system of *Dendrobium officinale* [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 2012, 43(7): 1412–1417.
常美花, 金亚征, 王莉. 铁皮石斛快繁技术体系研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(7): 1412–1417.
- [14] Li D, Wang X C, Yin M H. The preliminary study of protocorm induction and its redifferentiation as well as axillary bud germination and rooting of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. cv. Heijie [J]. *J Shangrao Norm Univ*, 2010, 30(6): 73–78.
李丹, 王馨彩, 尹明华. 黑节铁皮石斛原球茎诱导, 再分化以及腋芽萌发和生根的初步研究 [J]. *上饶师范学院学报*, 2010, 30(6): 73–78.
- [15] Zhan Z G, Xu C, Zhang M, et al. Plant regeneration through somatic embryogenesis on root-tip explants of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo [J]. *J Zhejiang Univ (Agri Life Sci)*, 2005, 31(5): 579–580.
詹忠根, 徐程, 张铭, 等. 铁皮石斛离体根尖经体细胞胚再生植株研究 [J]. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2006, 31(5): 579–580.
- [16] Cueva A, Concia L, Cella R. Molecular characterization of a *Cyrtorchilum loxense* somatic embryogenesis receptor-like kinase (*SERK*) gene expressed during somatic embryogenesis [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31(6): 1129–1139.
- [17] Villavicencio M, Jhomara J. Evaluación de la expresión del gen *SERK* en diferentes tejidos, durante la embriogénesis somática en *Cattleya maxima* Lindl. [D]. Loja-ecuador: University Te'cnica Particular de Lola, 2012: 7–45.
- [18] Wang T, Zhang N H, Du L F. Isolation of RNA of high quality and yield from *Ginkgo biloba* leaves [J]. *Biotechn Lett*, 2005, 27: 629–633.
- [19] Gao Y, Xi M L, Wang G F, et al. Molecular characterization and expression analysis of *PmSERK1* during somatic embryogenesis in masson pine [J]. *Mol Plant Breed*, 2010, 8(1): 53–58.
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, 8(1): 53–58.
- [20] Li L, Zhang L F, Qi L W, et al. Characterization and expression of the somatic embryogenesis receptor-like kinase 1 (*SERK1*) gene during somatic embryogenesis of *Larix kaempferi* [J]. *For Res*, 2013, 26(6): 673–680.
李龙, 张立峰, 齐力旺, 等. 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 [J]. *林业科学研究*, 2013, 26(6): 673–680.
- [21] Zhang T T, Huang X, Chen Y F, et al. Expression of *SERK-like* gene in explants and the relative cultures of banana (*Musa ABB*, cv. Dajiao) [EB/OL]. Beijing: Sciencepaper Online. [2009–01–16] <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/200901-832>.
章婷婷, 黄霞, 陈云凤, 等. 大蕉各种外植体及其培养物中的 *SERK* 表达 [EB/OL]. 北京: 中国科技论文在线. [2009–01–16] <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/200901-832>
- [22] Kim M H, Kim Y, Kim J W, et al. Identification of *Arabidopsis* BAK1-associated receptor-like kinase 1 (*BAK1*) and characterization of its gene expression and brassinosteroid-regulated root phenotypes [J]. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54(10): 1620–1634.
- [23] 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 Physiol*, 2003, 133(1): 218–230.