

甘蔗*ScBAK1*基因及其可变剪接体的克隆与表达分析*

肖新换[#] 黄琰[#] 黄宁 张玉叶 凌辉 刘峰 苏炜华 阙友雄^{**}

福建农林大学农业部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室 福州 350002

摘要 可变剪接 (Alternative splicing, AS) 是真核生物基因表达调控研究的热点。BAK1 (Brassinosteroid insensitive-1-associated receptor kinase 1) 是植物中丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的一种, 可调控植物的生长发育及先天免疫反应。为揭示BAK1基因在甘蔗应答不良外界环境方面的作用, 利用电子克隆及RT-PCR方法从甘蔗品种崖城05-179叶片cDNA中克隆到1个BAK1基因及其1个可变剪接体, 分别命名为*ScBAK1* (GenBank登录号: KP032226) 和*ScBAK1 SI* (GenBank登录号: KP032227)。生物信息学分析结果表明, *ScBAK1/ScBAK1 SI*基因的ORF长1 860 bp/1 770 bp, 编码蛋白含有619/589个氨基酸残基, 分子量 (M_r) 为 $6.928 \times 10^4/6.576 \times 10^4$; 两种编码蛋白均定位于质膜上, 含有信号肽, 为酸性、分泌脂溶性蛋白; 它们的二级结构以 α -螺旋和无规则卷曲为主, 其次是延伸链, 无 β -螺旋; 蛋白功能预测显示其主要作为细胞膜蛋白, 还参与氨基酸及辅酶因子生物合成。荧光定量PCR分析结果显示, *ScBAK1 SI*基因的表达在非生物 (水杨酸SA、CuCl₂、PEG、脱落酸ABA、NaCl、茉莉酸甲酯JA) 和生物胁迫 (黑穗病菌) 下均受到抑制, 而*ScBAK1*却受SA、CuCl₂、PEG、NaCl和黑穗病菌的诱导。结果还表明, 相较于*ScBAK1*在甘蔗抗黑穗病性、渗透胁迫以及细胞生长方面发挥作用来说, *ScBAK1 SI*缺失的氨基酸序列或数目在*ScBAK1*的抗逆性方面扮演了重要角色。*ScBAK1*和*ScBAK1 SI*的不同丰度表达为深入解析*ScBAK1*基因在生物和非生物逆境条件下的功能奠定了基础。图6 表1 参56

关键词 甘蔗; BAK1基因; 可变剪接; 生物信息学; 荧光定量PCR

CLC Q78 : S566.103.4

Cloning and expression analysis of *ScBAK1* gene and its alternative spliceosome in sugarcane*

XIAO Xinhuan[#], HUANG Long[#], HUANG Ning, ZHANG Yuye, LING Hui, LIU Feng, SU Weihua & QUE Youxiong^{**}

Key Laboratory of Sugarcane Biology and Genetic Breeding (Fujian), Ministry of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract Alternative splicing (AS) is an important part of regulation of eukaryotic gene expression. BAK1 (Brassinosteroid insensitive-1-associated receptor kinase 1) is a specific type of plant serine/threonine protein kinases, and can regulate growth and development and natural immunization. To reveal the responses of sugarcane *BAK1* gene to the adverse environment, a *ScBAK1* gene and its alternative spliceosome, termed *ScBAK1* (GenBank accession number: KP032226) and *ScBAK1 SI* (GenBank accession number: KP032227), were cloned from leaf cDNA of Yacheng 05-179 utilizing the methods of electronic cloning and RT-PCR. The open reading frame (ORF) length of *ScBAK1/ScBAK1 SI* gene was 1 860bp/1 770bp, encoding 619/589 amino acids residues. The predicted molecular weight of the protein was 69.28 kDa/ 65.76 kDa. Both proteins were located in plasma membrane, estimated as acid, hydrophobic and secretory proteins. Random coil and alpha helix gave priority to extended strand in their secondary structure without beta turn. The most important protein function was cell envelope, secondly biosynthesis of amino acids and cofactors. Real-time quantitative PCR analysis revealed that the expression of sugarcane *ScBAK1 SI* gene exhibited the reduced expression trend under smut fungus stress and various abiotic exogenous stresses, including SA, CuCl₂, PEG, ABA, NaCl and JA, while the expression of *ScBAK1* gene was induced by SA, CuCl₂, PEG, NaCl and smut fungus stresses. The phenomenon showed that the absent sequences or amounts of *ScBAK1 SI* gene plays a key role in the response of *ScBAK1* to the stress of sugarcane smut fungus, osmotic stress and cell growth. The differential

收稿日期 Received: 2015-03-08 接受日期 Accepted: 2015-05-26

*国家自然科学基金项目 (31340060)、福建省杰出青年基金项目 (2015J06006) 和福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划项目 (JA14095) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (31340060), the Natural Science Foundation of Fujian Province (2015J06006) and the Program for New Century Excellent Talents in Fujian Province University (JA14095)

[#]共同第一作者 Joint first authors

^{**}通讯作者 Corresponding author (E-mail: queyouxiong@126.com)

expression of *ScBAK1* and *ScBAK1 SI* lays a foundation for further research on the function of *ScBAK1* gene under biotic and abiotic stress.

Keywords sugarcane; *BAK1* gene; alternative splicing; bioinformatics; RT-qPCR

类受体蛋白激酶 (Receptor-like protein kinase, RLK) 是植物体内普遍存在的一类蛋白激酶, 能够感受外界刺激, 通过磷酸化作用参与胞内信号传递, 在植物生长发育过程中发挥重要作用^[1]. 油菜素内酯不敏感受体激酶1 (Brassinosteroid insensitive1-associated receptor kinase 1, BAK1), 即体细胞胚胎发生受体激酶3 (Somatic embryogenesis receptor kinase 3, SERK3), 属于体细胞胚胎发生受体激酶 (SERK) 蛋白家族^[2], 也是一种典型的富含亮氨酸重复序列的跨膜类受体蛋白激酶 (Leucine-rich repeat receptor-like kinase, LRR-RLK), 由胞外域、跨膜域及胞内激酶结构域组成. *SERK* 基因家族成员由基因拷贝而产生, 在功能上存在冗余, 但在进化中会产生功能特异性的分化^[3].

前人研究发现, 在高浓度的油菜素内酯 (Brassinosteroids, BR) 环境中, BAK1与BR不敏感受体 (Brassinosteroid insensitive1, BRI1) 互作, 形成异源二聚体, 进而通过磷酸化作用激活相应的激酶活性, 从而介导BR信号转导途径, 调节植物生长发育^[4]. 此外, BAK1还能与识别多种病菌相关分子 (Microbe-associated molecular patterns, MAMPs) 的识别受体 (Pattern recognition receptors, PRRs) 共同作用^[5-6], 激活植物的第一道免疫防线^[7]. 鞭毛蛋白受体FLS2 (Flagellin Sensing 2) 是一种典型的MAMPs受体, 其结构与BRI1相似, 能识别细菌鞭毛蛋白^[8-9]. BAK1可以与FLS2结合形成异源二聚体, 参与植物内源免疫反应^[8]. 近年来, 又相继发现BAK1与过表达细菌效应蛋白^[3,6]、钙依赖型磷脂结合蛋白BON1^[10]、灰葡萄孢诱导的蛋白激酶1 (Botrytis-induced kinase 1, BIK1) 及E3泛素连接酶 (PUB12和PUB13)^[11]等相互作用, 调节植物对病原菌的防御反应、调控依赖温度的植物生长和细胞死亡以及抑制植物先天免疫反应等.

Wang等研究水稻中过表达拟南芥*BAK1*基因发现, 转基因水稻半矮化、主根变短, 几个BR诱导基因在转基因株系中上调表达, 说明*BAK1*确实影响了水稻中的BR信号转导^[12]. 研究表明, 烟草中的*BAK1*, 既可介导对食草性昆虫的免疫反应^[13], 还能够识别真菌INF1分子, 介导MAMP反应, 激活对马铃薯晚疫病菌的抗性^[14]. 杨辉等的研究揭示, *BAK1*能够增强宿主对病毒的防御作用, 在接种芜菁缩叶病毒 (Turnip crinkle virus, TCV) 后, 拟南芥*BAK1*缺陷型植株对TCV较为感病, 其衰老相关基因上调表达^[15]. Vicentini等发现, *BAK1*能通过某种代谢途径, 促进糖分积累; 含糖量较高的甘蔗植株中*BAK1*基因的表达量也较高, 且其转录物的累积主要在成熟叶片中, 更确切地说是在叶片的束鞘细胞^[16].

可变剪接 (Alternative splicing, AS) 指的是某些基因的同mRNA前体在产生成熟mRNA的过程中, 通过不同的剪接方式剪除内含子, 从而使该基因可以表达出多个不同的相关蛋白产物, 行使不同的生理功能^[17-19]. AS被认为是导致蛋白质功能多样性及控制基因表达的重要机制之一, 也是产生基因组规模与生物复杂性之间的矛盾根源之一^[20]. 已有实验研究表明, AS在产生受体多样性^[21-22]、控制调节生长发

育^[22-23]等方面起决定性作用.

甘蔗是我国主要的糖料作物之一, 然而, 甘蔗在生长过程中, 经常遭受各种不利环境因素的伤害. 因此, 克隆和鉴定甘蔗中与各种抗性及相关经济性状相关的基因, 为基于转基因技术改良甘蔗品种的目标抗性提供具有自主知识产权的基因资源就显得尤其重要. 目前, *BAK1*基因虽然在甘蔗中已有报道^[16], 且其它物种的报道中也指出*BAK1*基因可能与抗病性相关^[14-15], 但甘蔗中该基因的可变剪接情况及其在抗黑穗病性中的作用的研究尚未见报道. 本研究以甘蔗品种崖城05-179 (YC05-179) 叶片的cDNA为实验材料, 综合应用电子克隆和RT-PCR技术, 成功克隆到1个甘蔗*BAK1*基因及其可变剪接体 (*ScBAK1 SI*), 而后在生物信息学分析的基础上, 进行实时荧光定量PCR表达特性研究, 旨在为进一步深入研究这些基因的功能奠定必要的理论和实践基础.

1 材料与方法

1.1 植物材料及处理

供试甘蔗品种为YC05-179, 由福建农林大学农业部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室提供. (1) 从田间选取健康、长势一致的蔗茎, 砍成单芽茎段后, 洗净并用含多菌灵的水溶液温育, 然后在高压无菌土中培育出无菌苗. 切下无菌苗进行离体扩繁. 选取长势一致的蔗苗, 水培10 d, 每个不同处理和不同时间点均设3株蔗苗, 作为生物学重复. 分别用高盐 (NaCl, 250 mmol/L)、模拟干旱 (PEG8000, 25.0%)、氯化铜 (CuCl₂, 500 mmol/L)、脱落酸 (ABA, 100 μmol/L)、水杨酸 (SA, 5 mmol/L) 和茉莉酸甲酯 (JA, 100 μmol/L) 水溶液培养蔗苗. 取样时间点根据预备实验设定, 其中NaCl、CuCl₂处理的取样时间为12、24和48 h; PEG、ABA、SA和JA处理的取样时间为6、12和24 h^[24], 0 h未处理的蔗叶作为对照^[24]. 此部分材料用于研究目的基因受不同外源非生物胁迫后的表达特性. (2) 从田间选取生长健壮、长势一致的蔗茎, 光照培养箱中水培至芽萌动, 用5 × 10⁶个/mL黑穗病菌孢子悬浮液^[25]针刺接种处理萌发蔗芽, 取黑穗病菌胁迫0 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h和120 h后的甘蔗芽, 其中胁迫0 h的蔗芽作为对照. 此部分材料用于研究目的基因在生物胁迫处理后的表达特性. 以上取样的所有植物材料均应立即投入液氮中, 然后置于-80 °C冰箱中保存.

1.2 方法

1.2.1 甘蔗*ScBAK1*基因的电子克隆 甘蔗EST (CF571249.1) 为丝氨酸/苏氨酸激酶基因序列片段, 通过电子克隆策略, 以该EST序列为探针, 应用NCBI网站上的在线序列比对软件BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 检索甘蔗EST数据库, 得到与探针序列有同源性的甘蔗EST序列群. 将所得的EST序列在甘蔗EST数据库中进行反复比对, 直到没有新序列出现为止. 使用CAP3 (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>) 软件, 对所得到的所有甘蔗EST序列进行拼接组装,

得到Contig序列,命名为*ScBAK1*。最后,使用NCBI中的ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)服务器,对最终获得的cDNA序列进行开放读码框分析并进行蛋白翻译。

1.2.2 总RNA提取和cDNA合成 采用Trizol法提取甘蔗YC05-179叶片及经CuCl₂、NaCl、PEG、SA、JA、ABA和黑穗病菌胁迫处理及其对应对照组材料的总RNA。DNaseI处理RNA样品后,用TaKaRa公司的PrimeScript™ RT-PCR Kit反转录试剂盒合成cDNA,作为PCR的模板。

1.2.3 甘蔗*ScBAK1*基因的RT-PCR扩增及测序 使用Primer 5.0软件,根据电子克隆所得的*ScBAK1*基因序列,设计一对特异性RT-PCR扩增引物,引物序列见表1中的*ScBAK1*-1F和*ScBAK1*-1R。以YC05-179叶片的cDNA为模板,对目的基因*ScBAK1*进行RT-PCR扩增。PCR反应体系为25 μL: ddH₂O 17.375 μL, 10 × GC Buffer 2.5 μL, 10 mmol/L dNTPs 2.0 μL, 引物各1.0 μL, Ex Taq酶0.125 μL, cDNA模板1.0 μL。PCR反应程序: 94 ℃ 4 min; 94 ℃ 1 min, 48 ℃ 45 s, 72 ℃ 3 min, 35个循环; 72 ℃ 10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,用Gel Extraction Kit对扩增产物进行纯化回收,并与pMD19-T载体在16 ℃连接过夜,连接产物转化到大肠杆菌DH5α感受态细胞中。在含Amp的LB平板上进行蓝白斑筛选,筛选出单菌落的阳性克隆。挑取单一的白色菌落旋转培养5 h后,进行菌液PCR鉴定,将含有目的片段长度的菌液送至华大基因公司进行测序,并使用DNAMAN软件,将测序结果与电子克隆序列进行同源性比对。

1.2.4 甘蔗*ScBAK1/ScBAK1 SI*基因序列的生物信息学分析 甘蔗*ScBAK1*基因的RT-PCR扩增获得2条序列,经分析其中一条为甘蔗*ScBAK1*基因序列,另一条为该基因的可变剪接体(*ScBAK1 SI*)。将甘蔗*ScBAK1*基因和*ScBAK1 SI*基因(*ScBAK1/ScBAK1 SI*) cDNA序列进行生物信息学分析。利用ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>)、GOR IV (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html)、SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、Psort (<http://psort.hgc.jp/form.html>)、ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)、Profun 2.2 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>)软件,对这两个基因的编码蛋白进行一级结构、二级结构、保守结构域、信号肽、疏水性亲水性、亚细胞定位及蛋白功能等进行分析和预测,同时在Blast上查找它们的同源氨基酸序列并用DNAMAN软件和MEGA5.0软件分别进行氨基酸序列比对和系统进化分析。

1.2.5 甘蔗*ScBAK1/ScBAK1 SI*基因的荧光定量PCR分析 根据甘蔗*ScBAK1*基因的保守结构域序列,设计两对荧光定量PCR引物*ScBAK1*-2F、*ScBAK1*-2R、*ScBAK1*-3F、*ScBAK1*-3R(其中*ScBAK1*-2F和*ScBAK1*-2R设在仅*ScBAK1*能表达的区域,*ScBAK1*-3F和*ScBAK1*-3R设在*ScBAK1*和*ScBAK1 SI*都能够表达的区域)。分别以甘蔗YC05-179经SA、ABA、JA、NaCl、CuCl₂、PEG和黑穗病菌胁迫处理后的cDNA及其对应对照组的cDNA为模板,以*GAPDH*为内参基因^[26]进行荧光定量PCR。荧光定量PCR的引物序列见表1。按照SYBR Green PCR Master Mix Kit (Roche)说明书配置定量反应体系。荧光定量PCR扩增程序为: 50 ℃ 2 min; 95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 45个循环; 增加溶解曲线; 反应时每个样品设置3次重

复。采用2^{-ΔΔCT}算法^[27-28][其中ΔCT_{*ScBAK1*}=CT_{*ScBAK1*-2F/R}-CT_{*GAPDH*}, ΔCT_{*ScBAK1 SI*}=(CT_{*ScBAK1*-3F/R}-CT_{*GAPDH*})-(CT_{*ScBAK1*-2F/R}-CT_{*GAPDH*})^[29]]来计算荧光定量PCR实验数据,并在Excel工作表中进行数据分析和作图。

表1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')
<i>ScBAK1</i> -1F	TTCTTCCCCCTCCTCTTGC
<i>ScBAK1</i> -1R	GGTGTGGTCCTATCGTTGT
<i>ScBAK1</i> -2F	TGGAACCTAATCAACGCCCTAC
<i>ScBAK1</i> -2R	TTCCCTGTTGCCTCATCTCA
<i>ScBAK1</i> -3F	AGGGCTTCGTGGGACTATGG
<i>ScBAK1</i> -3R	ATCGGTCAGGATGGAATGC
<i>GAPDH</i> F	CACGGCCACTGGAAGCA
<i>GAPDH</i> R	TCCTCAGGGTTCCTGATGCC

2 结果与分析

2.1 甘蔗*ScBAK1*基因的电子克隆和RT-PCR扩增验证

以甘蔗丝氨酸/苏氨酸激酶基因EST序列 (Genbank accession number: CF571249.1) 作为查询探针,经电子克隆后得到1个cDNA全长为2 672 bp的BR11受体激酶基因。ORF软件分析显示,该cDNA序列包含1个长度为1 860 bp的完整开放阅读框,编码619个氨基酸(图1)。分析发现,该电子克隆序列的ORF框所编码蛋白与Vicentini等人发现的*ScBAK1*基因 (GenBank登录号: EU189960)的ORF框编码蛋白相似度达99.19%^[16],说明该cDNA序列的正确性。

经RT-PCR扩增后,分离出约2 000 bp的特异条带。PCR产物经回收后转入大肠杆菌*E. coli* DH5α,选取含有目的条带的菌液送到华大基因公司测序。测序结果显示有两种长度不同的片段,其中,有11条序列与引物间的电子克隆的序列相似度达97.96%,推测该序列为甘蔗*BAK1*基因,命名为*ScBAK1* (GenBank登录号: KP032226);另2条序列与引物间的电子克隆序列基本一致(相似度93.55%),但在2 194-2 284 bp处缺失(图1),推测测序所得的这2条序列片段是电子克隆序列经过剪接后的序列,命名为*ScBAK1 SI* (GenBank登录号: KP032227)。此外,如图1所示,*ScBAK1 SI*基因中90 bp碱基序列的缺失只是*ScBAK1*基因在2 194-2 284 bp处被切除,并没有造成移码突变,因此,此种剪接方式在一定程度上不影响*ScBAK1*基因原有的编码蛋白的方式;此外,鉴于在不同的可变剪接过程中,外显子和内含子是存在角色互换的,即在一种剪接方式中的内含子,可能是另一种剪接中的外显子,因此作者认为本研究所获得的可变剪接是一个外显子缺失还是某个外显子的一部分缺失,尚有待进一步的研究。从图2可以看出,甘蔗*ScBAK1*蛋白的蛋白激酶催化区域位于294-567氨基酸之间,而本研究中发现的*ScBAK1 SI*却在558-587氨基酸之间缺失,表明该缺失片段破坏了甘蔗*ScBAK1*蛋白的激酶催化区域。

2.2 甘蔗*ScBAK1/ScBAK1 SI*基因的生物信息学分析

使用多种生物信息学软件分析甘蔗*ScBAK1/ScBAK1 SI*基因编码蛋白的功能,结果如下: ExPASy和ProtScale在线工具分析显示,两种编码蛋白分子量(*M_r*)为6.928×10⁴/6.576×10⁴,等电点(*PI*)为5.79/5.88,脂肪系数(*AI*)为100.61/99.95,

```

1   CTGCTCCACTCTACCAAAATCTTATGCCAAAAGACTGTAGGACCATGTTATGAGATTAGAAGATCTACTAGTGGGATAATTTAGTCG
91  GATAAAGATCTCCGTGCAGATATGGGTTTGTGAGCCGGTATTCACAGCCCTAGGATTACAAGTGGGAATCTGTACGGTAGCCAATACGA
181 GCCGTTCGCGCGCGATCAATGAGATGGTCAGAATTACCTCCTCTGCTTCGGAGCGCTCCGATAAAATTTGACCATCAATTTGCTCTCT
271 CACTCAGTCTCAGCTCAGGGCTGAAGCTTCTCTCCACTATCCTCTTCCATGTCCTCGAACAACCTGAGTGTTCGTTATAAAGTCTGAGGT
361 TCAGAGAAAGTTCTAAGAAGCTGGGTGCACCGCAGGCTGATGCTTCTTCCCCTCCTCTTGCAGCCTAGCAGCAATTTCACTTCACAAG
451 GGCTCTTTTTTATTGAAGTAAACGAATCAGAGTATTCAGCGGCGCATCTGTTCTCGAAACAAAAAATCATGATATATTCAGAA
                                     M M I Y S E
541 ATAATGAATCTATTAGCTTTTGTGTTACTTCTGTGGGATGTCAACAGCTTTCTCTTCCCTCGCTATCGAATCCAAGTCGAAGCACTG
   I M N L L A F V L L L W G C Q Q L S L S L A I E F Q V E A L
631 GTTGAAATGAAGATGCAACTTGTAGATAACCGTGGTGTCTTAGTGATTGGAAGGATAATCAAATGAGCCCTGCTACTGGGAATATGTT
   V E M K M Q L V D N R G V L S D W K D N Q M S P C Y W E Y V
721 AATTGTCAAGACAACAAAGTTACAACAATAAATTTGAGCTCGTCTGGGTTAACAGGAACCTTATCACCAGCATTTGCTAAGCTAACAACT
   N C Q D N K V T T I T L S S S G L T G T L S P S I A K L T T
811 TTACAGCAGCTGAACTGGATAACAACAATAAATTTGAGGAGTTCCTCTGGAGTTTGGAAACCTATCAAGTTTGACAATTTCAAACCTT
   L Q I K L D N N N I T G G I P L E F G N L S S L T I L N L
901 GGAAGAAATAATTTAAATGGATCGATACCAGACTCCCTTGGACAACCTTTCTAACTCCAATTTCTGGATCTAAGCCACAATCATTTAAGT
   G R N N L N G S I P D S L G Q L S K L Q I L D L S H N H L S
991 GGAATATCCCAAGCTCTTTCTCAATCCTCCATCATGAATAACATTAATCTAGCACATAATAATATTAGCGCGAAATCCCACAACAT
   G N I P S S F S N P P S L N N I N L A H N N I S G E I P Q H
1081 CTACTTCAGGCGGCTCATTACAACCTTTACAGGCAACCACTGAATTTGGGCAAAATTTATTTCCATGTGAAGGAGGAGCAGACAAGGACA
   L L Q A A H Y N F T G N H L N C G Q N L F P C E G G S T R T
1171 GGTGGATCAAAAATCCAAAGCTAAAGTGGTTATTTGAAGCATTGCTGGAGCAGTCACTCTTTTGTAAACAGTAGTTCTAGTTTGTCTA
   G G S K N S K L K V V I G S I A G A V T L F V T V V L V L L
1261 TGGTGGCAAAAGATGCGTTACCGGCTGAAATCTTATTGACGTGTCAGGTGAGATCATATGCTTGAGTTTGGGCAAAATTAAGAGG
   W W Q R M R Y R P E I F I D V S G Q N D H M L E F G Q I K R
1351 TTCTATGGCGGAGCTTCAAGTGAACCAACAATTTCAAGTGAACAGATGTTCTTGGCAAGGTTGGTTTGGTAAGGTGTATAAAGGA
   F S W R E L Q I A T N N F S E Q N V L G K G G F G K V Y K G
1441 GTACTCCACGTCCTCAACAGTATAAAGATCGCAGTGAACCACTACTCAACGTGAACAGTCTGGAAGGGGAAATGGCTTTCTCAGAGAA
   V L P R P N S I K I A V K P L L N V N S R E G E M A F L R E
1531 GTTGAAATGATAAGCATTGCTGTGCACAAGACATATTAAGGTTGATAGGATTTTGTACAACAACAAGAGAGGCTCTTGGTCTACCTT
   V E L I S I A V H K N I L R L I G F C T T T T E R L L V Y P
1621 TTCATCCAGAAATCTCAATGTTGCTTCCCGTTAAGAGATATAAACTAAACGAACAGCGTTAGATTGGTCTACAAGATGCAAGTTCGCT
   F M E N L N V A S R L R D I K L N E P A L D W S T R M R I A
1711 CCTGGTGTGCCCGTGGTTTGAATACCTCAGGACTGCAATCCCAAGATCATCCACAGTGACGTCAAGGCTGCAATGCTGCTGCTT
   P G A A R G L E Y P H E H C N P K I I H S D V K A A N V L L
1801 GATGGGAATTTGAAGCAGTCGTAGGAGATTTTGGGTTGGCGAAGATGATGGACATAGGAGGAATACAGTAACAACAGGCGTTCGTGGG
   L G N F E A V V G D F G L A K M M D I G R N T V T T G L R G
1891 ACTATGGGCCATAGCTCCTGAGTACATAAAGACGGGAAGCCATCAGTGAAGACAGATATCTTTGGATATGGTGTATGCTGTTAGAG
   T M G H I A P E Y I K T G R P S V K T D I F G Y G V M L L E
1981 ATTGTGACAGGAGATCGTCAATTCGATTCCTGACCGCATAGAAGAAGCAGGGGAGATCATGCTCATTGATCAGGTCAAGCTATGG
   I V T G D R A I A F H P D R I E E A G E I M L I D Q V K L W
2071 ATGGAAGAAGGGGCGACTACTCGACTAGTAGATCACAATCTAGGAGGCGTCTACAACCTTGAAGAGCTGGAGAAGGTTACCCAGATAGCA
   M E E G R L L D L V D H N L G G V Y N L E E L E K V T Q I A
2161 CTTCTGCAACCCATGGAACCTAATCAACGCCTACAATGTCGGAGGTCGTGCAGATGCTGGAAGGAGAGATTGTCACGAGCAGAGCGG
   L L C T H M E P N Q R P T M S E V V Q M L E G E I V P E R
2251 TGGGAGGAATGGCAGCTGGCTGAGCTCAACGACGACAACAGCATGAGATGAGGCAACAGGAAAACTATTCGACTTCAGTGAAGAGTCT
   W E E W Q L A E L Q R R Q Q H E M R Q Q G K L F D F S E E S
2341 CTAACATCCAGGAAGCCATTGAGTTGTCAACTGGCAGATGAGCTGCATAAGAAAGTACATGATTTTCACTTGTTCCTTAAGTAGAAA
   L N I Q E A I E L S T G R *
2431 GGCTATGGAAATTCAGGAGTATGCACTACAGATATTGACTATTAGGAATAGTCTATAAGGTCCTGATGTAATAGCTGCACAAGTAA
2521 CTCCATCCATATGCTGTTAATACAACGATAGGACCACCTAGCTCAGACCATGTGTATATTAAGACTATAGACTGTCTACATTTAAT
2611 TGCATTCTGTATTAGTGGAAAAAAGAAAAAAGGAGCGGAGAAAAAGAGACAAAAA

```

图1 获得的甘蔗*ScBAK1/ScBAK1 SI*基因的cDNA全长序列及其氨基酸序列(*终止密码子)。红色部分为缺失的碱基序列。

Fig. 1 cDNA sequence and amino acid sequence of sugarcane *ScBAK1/ScBAK1 SI* gene obtained (*stop codon). The red sections are the absent base sequences.

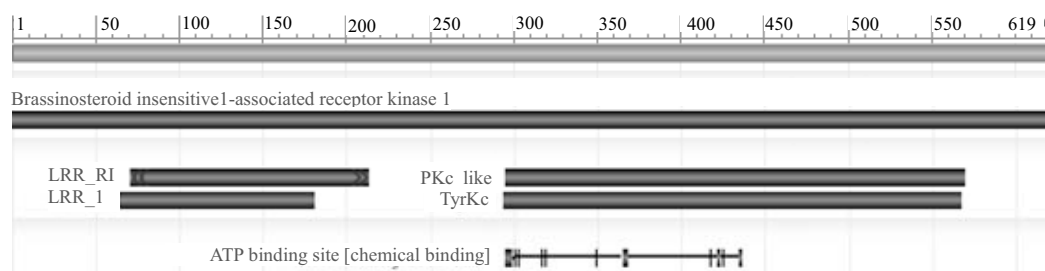


图2 获得的甘蔗*ScBAK1*蛋白的模式图。PKc_like: 295-569, 蛋白激酶超家族的催化域; TyrKc: 294-567, 酪氨酸激酶、催化域。

Fig. 2 Structural model of sugarcane *ScBAK1* protein obtained. PKc_like: 295-569, catalytic domain of the protein kinase superfamily; TyrKc: 294-567, tyrosine kinase, catalytic domain.

不稳定系数(Ⅱ)为39.03/35.38, GRAVY为-0.126/-0.11, 推测甘蔗ScBAK1/ScBAK1 S1蛋白均为酸性脂溶蛋白; GOR IV 在线工具分析两种蛋白的二级结构, 结果显示, ScBAK1/ScBAK1 S1蛋白均含有 α -螺旋、无规则卷曲和延伸链, 无 β -螺旋, 但所占比例有所不同[ScBAK1 S1蛋白中 α -螺旋所占比例(41.60%)和无规则卷曲(41.94%)相当, ScBAK1蛋白中无规则卷曲所占比例(44.9%)大于 α -螺旋(39.58%)]。SignalP 4.1 Server和Psort在线工具分析这两种蛋白, 结果显示它们的结果一致, 即都存在信号肽, 可能定位于质膜、内质网膜/腔和胞外, 其中质膜的概率最高(0.46), 故推测这两种蛋白合成后, 经内质网加工, 再转到质膜上, 为分泌蛋白; Profun 2.2 Server在线工具分析这两种蛋白功能, 结果显示, 两种蛋白的最主要功能指向均为细胞膜蛋白, 其次是氨基酸及辅因子生物合成, 也有可能参与了能量新陈代谢等, 但ScBAK1蛋白的氨基酸生物合成功能的可能性较ScBAK1 S1蛋白小得多, 且ScBAK1蛋白还可能具有翻译功能。

使用NCBI中的protein blast程序, 对甘蔗ScBAK1/ScBAK1 S1蛋白的氨基酸进行同源性分析。在结果中选取甘蔗(*Saccharum officinarum_gb|ABX83681.1|*)、高粱(*Sorghum bicolor_emb|CAB51480.1|*)、玉米(*Zea mays_gb|ACG24312.1|*)、小米(*Setaria italic_ref|XP_004979667.1|*)、短花药野生稻(*Oryza brachyantha_ref|XP_006663040.1|*)、二穗短柄草(*Brachypodium distachyon_ref|XP_003577373.1|*)、节节草(*Aegilops tauschii_gb|EMT13276.1|*)、梅(*Prunus mume_ref|XP_008234117.1|*)和桃(*Prunus persica_gb|EMJ09226.1|*)进行蛋白比对分析(图3), 其中, ScBAK1 S1蛋白与甘蔗(ABX83681.1)的序列相似性最高(92%), 其次是高粱(CAB51480.1)(91%)。蛋白比对显示(图3), 这些物种中BAK1蛋白的序列长度为579-645个氨基酸不等, 且C端相对保守。

利用MEGA5.0软件构建系统进化树(图4), 结果显示, 甘蔗与高粱、玉米、小米等草本植物属一大分支(I), 梅和

ABX83681.1	MMIYSEINLLAFVLLLVGCGQQLSLSLAIEFQVEALVEMKMLVDNRGVLSDWKDNQMS
CAB51480.1	MMRHSEINMLLAFVLLLVGCGQQLSLSLAIEFQVEALVEMKMLVDNRGVLSDWKDNQMS
ACG24312.1	MKLLAFVLLLVGCGQQLSLSLAIEFQVEALVEMKMLVDNRGVLSDWKDNQMS
XP 004979667.1	MKLLAFVLLLVGCGQQLSLSLAIEFQVEALVEMKMLVDNRGVLSDWKDNQMS
XP 006663040.1	MKLLAFVLLLVGCGQQLSLSLAIEFQVEALVEMKMLVDNRGVLSDWKDNQMS
XP 003577373.1	MPSSKQNIQELSSSVLKKKNKLEMVSES...FAAIDLVQVIALNEMRTMLNDSRGVINDWNSNQVS
EMT13276.1	MKLLAFVLLLVGCGQQLSLSLAIEFQVEALVEMKMLVDNRGVLSDWKDNQMS
XP 008234117.1	MELIFAVLVLAQLCS...FALPDSQGEALYSLRTSLNSSPEQLKDWNNINQVN
EMJ09226.1	MELIFAVLVLAQLCS...FALPDSQGEALYSLRTSLNSSPEQLKDWNNINQVN
SCBAK1	MMIYSEINLLAFVLLLVGCGQQLSLSLAIEFQVEALVEMKMLVDNRGVLSDWKDNQMS
SCBAK1 S1	MMIYSEINLLAFVLLLVGCGQQLSLSLAIEFQVEALVEMKMLVDNRGVLSDWKDNQMS
Consensus	f c q l l w nq
ABX83681.1	PCYWEYVNCQ.DNKVTTITLSSSGITGTLSPSIAKLTTLQQLKLDNNITGGIPLEFGLNLSSTILNLGRNNINGSIPTDSL
CAB51480.1	PCYWEYVNCQ.DNKVTTITLSSSGITGTLSPSIAKLTTLQQLKLDNNITGGIPLEFGLNLSSTILNLGRNNINGSIPTDSL
ACG24312.1	PCYWANVNCQ.DNKVTTITLSSSGITGTLSPSIAKLTTLQQLKLDNNITGGIPLEFGLNLSSTILNLGRNNINGSIPTDSL
XP 004979667.1	PCYWDHVTCQ.DNKVTTITLSSSGITGTLSPSIAKLTTLQQLKLDNNITGGIPLEFGLNLSSTILNLGRNNINGSIPTDSL
XP 006663040.1	PCYFNAIICNQDQVTSITLSSSGITGTLSPSIAKLTTLQQLKLDNNITGGIPLEFGLNLSSTILNLGRNNINGSIPTDSL
XP 003577373.1	PCYFVNVRNCDGNVIGITLSSSGITGTLSPSIAKLTTLQQLKLDNNITGGIPLEFGLNLSSTILNLGRNNINGSIPTDSL
EMT13276.1	PCYFDNVRCDQGVIGITLSSSGITGTLSPSIAKLTTLQQLKLDNNITGGIPLEFGLNLSSTILNLGRNNINGSIPTDSL
XP 008234117.1	PCTWSNVNCDPNKVTSTLNSIGFSGILSPKLGALTTLQQLKLDNNITGGIPLEFGLNLSSTILNLGRNNINGSIPTDSL
EMJ09226.1	PCTWSNVNCDPNKVTSTLNSIGFSGILSPKLGALTTLQQLKLDNNITGGIPLEFGLNLSSTILNLGRNNINGSIPTDSL
SCBAK1	PCYWEYVNCQ.DNKVTTITLSSSGITGTLSPSIAKLTTLQQLKLDNNITGGIPLEFGLNLSSTILNLGRNNINGSIPTDSL
SCBAK1 S1	PCYWEYVNCQ.DNKVTTITLSSSGITGTLSPSIAKLTTLQQLKLDNNITGGIPLEFGLNLSSTILNLGRNNINGSIPTDSL
Consensus	pc c v ls g g lsp l l l n itg ip e g l l l l n l g ip
ABX83681.1	QQLSKLQILDLSHNHLSGNIPSSFSNPPSLNNINLAHNNISGEIPQHLQAAHYNFTGNHLNCGQNL.FPCEGGSTRTGGS
CAB51480.1	QQLSKLQILDLSHNHLSGNIPSSFSNPPSLNNINLAHNNISGEIPQHLQAAHYNFTGNHLNCGQNL.FPCEGGSTRTGGS
ACG24312.1	QQLSKLQILDLSHNHLSGNIPSSFSNPPSLNNINLAHNNISGEIPQHLQAAHYNFTGNHLNCGQNL.FPCEGGSTRTGGS
XP 004979667.1	GRIPKLEIILDLSHNHLSGNIPSSFSNPPSLNNINLAHNNISGEIPQHLQAAHYNFTGNHLNCGQNL.FPCEGGSTRTGGS
XP 006663040.1	GRISKLQILDLSHNHLSGNIPSSFSNPPSLNNINLAHNNISGEIPQHLQAAHYNFTGNHLNCGQNL.FPCEGGSTRTGGS
XP 003577373.1	GLLSEIQILDLSHNHLSGNIPSSFSNPPSLNNINLAHNNISGEIPQHLQAAHYNFTGNHLNCGQNL.FPCEGGSTRTGGS
EMT13276.1	GLLSEIQILDLSHNHLSGNIPSSFSNPPSLNNINLAHNNISGEIPQHLQAAHYNFTGNHLNCGQNL.FPCEGGSTRTGGS
XP 008234117.1	QNLRELHFLSLNQNLGNIPSSFSNPPSLNNINLAHNNISGEIPQHLQAAHYNFTGNHLNCGQNL.FPCEGGSTRTGGS
EMJ09226.1	QNLRELHFLSLNQNLGNIPSSFSNPPSLNNINLAHNNISGEIPQHLQAAHYNFTGNHLNCGQNL.FPCEGGSTRTGGS
SCBAK1	QQLSKLQILDLSHNHLSGNIPSSFSNPPSLNNINLAHNNISGEIPQHLQAAHYNFTGNHLNCGQNL.FPCEGGSTRTGGS
SCBAK1 S1	QQLSKLQILDLSHNHLSGNIPSSFSNPPSLNNINLAHNNISGEIPQHLQAAHYNFTGNHLNCGQNL.FPCEGGSTRTGGS
Consensus	g l l l n l g ip s l la n s
ABX83681.1	KNSKLVVIGSIAGAVTILVTV.VVLVLLWQRM.R.YRPEIFIDVSGQNDHMLEFGQIKRFSWRELQIATNFFSEQNVLGKG
CAB51480.1	KNSKLVVIGSIAGAVTILVTV.VVLVLLWQRM.R.YRPEIFIDVSGQNDHMLEFGQIKRFSWRELQIATNFFSEQNVLGKG
ACG24312.1	KNFKLVVIGSIAGAVTILVTV.VVLVLLWQRM.R.YRPEIFIDVSGQNDHMLEFGQIKRFSWRELQIATNFFSEQNVLGKG
XP 004979667.1	KNSKLVVIGSIAGAVTILVTV.VVLVLLWQRM.R.YRPEIFIDVSGQNDHMLEFGQIKRFSWRELQIATNFFSEQNVLGKG
XP 006663040.1	KNSIVKLVVIGSIAGAVTILVTV.VVLVLLWQRM.R.YRPEIFIDVSGQNDHMLEFGQIKRFSWRELQIATNFFSEQNVLGKG
XP 003577373.1	RKSTLVVIGSIAGAVTILVTV.VVLVLLWQRM.R.YRPEIFIDVSGQNDHMLEFGQIKRFSWRELQIATNFFSEQNVLGKG
EMT13276.1	SNSTVKLVVIGSIAGAVTILVTV.VVLVLLWQRM.R.YRPEIFIDVSGQNDHMLEFGQIKRFSWRELQIATNFFSEQNVLGKG
XP 008234117.1	NKPKLGIHIGVVGGLIGLFFGGGLLYFICKRRHKGYKREIFVDVAGEVDRRAFGQLKRFWSWRELQIATNFFSEQNVLGKG
EMJ09226.1	NKPKLGIHIGVVGGLIGLFFGGGLLYFICKRRHKGYKREIFVDVAGEVDRRAFGQLKRFWSWRELQIATNFFSEQNVLGKG
SCBAK1	KNSKLVVIGSIAGAVTILVTV.VVLVLLWQRM.R.YRPEIFIDVSGQNDHMLEFGQIKRFSWRELQIATNFFSEQNVLGKG
SCBAK1 S1	KNSKLVVIGSIAGAVTILVTV.VVLVLLWQRM.R.YRPEIFIDVSGQNDHMLEFGQIKRFSWRELQIATNFFSEQNVLGKG
Consensus	g l r dv g d fgq kr swrelq at fse vlg g

续图3 Continued

ABX83681.1	GFGKVVYKGVLP	REDSIKI	IAVKPL	FNVES	REGEMAF	REVELIS	IAVHKNI	LRLIR	FCTTT	TERLL	VYPF	MENIN	VASRLRD														
CAB51480.1	GFGKVVYKGVLP	PGDSIKI	IAVKRL	FNVER	HEGELA	FLREVELIS	IAVHKNI	LRLIG	FCTTP	PTERRLL	VYPF	MENIS	VASRLRD														
ACG24312.1	GFGKVVYKGVLP	PGNSIKI	IAVKRL	LNVD	SRDGE	MAFLREVELIS	IAVHKNI	LRLIG	FCTTP	PTERRLL	VYPF	MENIS	VASRLRD														
XP 004979667.1	GFGKVVYKGVLP	PGDSIKI	IAVKRL	FDVQS	PEGEMAF	REVELIS	IAVHKNI	LRLIG	FCTTP	PTERRLL	VYPF	MENIS	VASRLRD														
XP 006663040.1	GFGKVVYKGVLP	GFHGKKV	AVKRL	FEVEK	PDGEI	AFREVELIS	IAVHKNI	LRLIG	FCTTP	PTERRLL	VYPF	MENIS	VASRLRD														
XP 003577373.1	GFGKVVYKGVLP	PGDGKKV	AVKRL	FEVES	PEGEMAF	REIELIS	IAVHKNI	LRLIG	FCTTP	PTERRLL	VYPF	MENIS	VASRLRD														
EMT13276.1	GFGKVVYKGVLP	PGDSKKV	AIKRL	FEVGS	PEGEMAF	REVELIS	IAVHKNI	LRLIG	FCTTP	PTERRLL	VYPF	MENIS	VASRLRD														
XP 008234117.1	GFGKVVYKGVLS	..DNTK	VAVKRL	TDYES	PGGEAA	QREVE	MISSAV	HRNLL	RIG	FCTTP	PTERRLL	VYPF	QNLIS	VAYRLRE													
EMJ09226.1	GFGKVVYKGVLS	..DNTK	IAVKRL	TDYES	PGGEAA	QREVE	MISSAV	HRNLL	RIG	FCTTP	PTERRLL	VYPF	QNLIS	VAYRLRE													
SCBAK1	GFGKVVYKGVLP	RENSIKI	IAVKPL	LNVS	REGEMAF	REVELIS	IAVHKNI	LRLIG	FCTTT	TERLL	VYPF	MENIN	VASRLRD														
SCBAK1 S1	GFGKVVYKGVLP	PGDSIKI	IAVKRL	FNVES	REGEMAF	REVELIS	IAVHKNI	LRLIG	FCTTP	PTERRLL	VYPF	MENIS	VASRLRD														
Consensus	gfgkvykgvl		k a k l		ge af re e	is avh n	lrli	fctt	terll	yp m nl	va rlr																
ABX83681.1	IKLNEP	FALDW	SRMRIA	P	GAARG	LEYL	HEHCNP	KIIHS	DVKAAN	VLLD	GNFE	AVVGD	FGLAK	MMDIG	RNTV	TTGL	RGT	MGH									
CAB51480.1	IKLNEP	FVLDW	SRMRIA	L	GAARG	LEYL	HEHCNP	KIIHR	DVKAAN	VLLD	GNFE	AVVGD	FGLAK	MMDIG	RNTV	TTG	VRG	TMGH									
ACG24312.1	IKLNEP	FALDW	SRMRIA	L	GAARG	LEYL	HEHCNP	KIIHR	DVKAAN	VLLD	GNFE	AVVGD	FGLAK	MMDIG	RNTV	TTT	G	VRG	TMGH								
XP 004979667.1	IKLNEP	FALDW	SRMRIA	L	GAARG	LEYL	HEHCNP	KIIHR	DVKAAN	VLLD	GNFE	AVVGD	FGLAK	MMDIG	RNTV	TTT	G	VRG	TMGH								
XP 006663040.1	IKLNEP	FALDW	SRMRIA	L	GAARG	LEYL	HEHCNP	KIIHR	DVKAAN	VLLD	GNFE	AVVGD	FGLAK	MMDIG	RNTV	TTT	R	VRG	TMGH								
XP 003577373.1	IKLNEP	FALDW	SRMRIA	L	GAARG	LEYL	HEHCNP	KIIHR	DVKAAN	VLLD	GNFE	AVVGD	FGLAK	MMDIG	RNTV	TTT	G	VRG	TMGH								
EMT13276.1	IKLNEP	FALDW	SRMRIA	L	GAARG	LEYL	HEHCNP	KIIHR	DVKAAN	VLLD	GNFE	AVVGD	FGLAK	MMDIG	RNTV	TTT	G	VRG	TMGH								
XP 008234117.1	IKLNEP	FALDW	SRMRIA	L	GAARG	LEYL	HEHCNP	KIIHR	DVKAAN	VLLD	GNFE	AVVGD	FGLAK	MMDIG	RNTV	TTT	G	VRG	TMGH								
EMJ09226.1	IKLNEP	FALDW	SRMRIA	L	GAARG	LEYL	HEHCNP	KIIHR	DVKAAN	VLLD	GNFE	AVVGD	FGLAK	MMDIG	RNTV	TTT	G	VRG	TMGH								
SCBAK1	IKLNEP	FALDW	SRMRIA	P	GAARG	LEYL	HEHCNP	KIIHS	DVKAAN	VLLD	GNFE	AVVGD	FGLAK	MMDIG	RNTV	TTT	G	VRG	TMGH								
SCBAK1 S1	IKLNEP	FVLDW	SRMRIA	L	GAARG	LEYL	HEHCNP	KIIHR	DVKAAN	VLLD	GNFE	AVVGD	FGLAK	MMDIG	RNTV	TTT	G	VRG	TMGH								
Consensus	i	ep ldw tr		a g a	gley	hehcn	pkiih	dvkaan	vll	d	eav	gdfglak	d		vtt	rgtmgh											
ABX83681.1	IAPEYIK	TGRPS	VKTDI	IFGYG	VMLLE	IVTGER	AI	AFHPD	RIE	EAGE	IMLI	DQVKL	WMEE	EGRI	LDL	V	DHNL	GGV	YNLEE	LEK							
CAB51480.1	IAPEYIK	TGRPS	VKTDI	IFGYG	VMLLE	IVTGER	AI	AFHPD	RIE	EAGE	IMLI	DQVKL	WMEE	EGRI	LDL	V	DHNL	GGV	YNLEE	LEK							
ACG24312.1	IAPEYIK	TGRPS	VKTDI	IFGYG	VMLLE	IVTGER	AI	AFHPD	RIE	EAGE	IMLI	DQVKL	WMEE	EGRI	LDL	V	DHNL	GGV	YNLEE	LEK							
XP 004979667.1	IAPEYIK	TGRPS	VKTDI	IFGYG	VTLL	IVTGER	VI	AFYP	...	EAGE	IMLI	DRVKL	MMEE	GQLE	AI	V	DRNL	IGD	LYNLEE	LEK							
XP 006663040.1	IAPEYIK	TGRPS	VKTDI	IFGYG	VMLLE	IVTGER	..	AI	FPD	FL	EAGE	IMLI	DQVKLL	VQGG	RI	T	D	IVDRNL	DNAYN	FEELAN							
XP 003577373.1	IAPEYIK	TGRPS	VKTDI	IFGYG	VMLLE	IVTGER	..	AI	FPD	FL	EAGE	IMLI	DQVKLL	MQE	GR	LE	I	LD	NRMDY	YDF	QELAN						
EMT13276.1	IAPEYIK	TGRPS	VKTDI	IFGYG	VMLLE	IVTGER	..	AI	FPD	FL	EAGE	IMLI	DQVKLL	MQE	GR	LE	I	LD	NRMDY	YDF	QELAN						
XP 008234117.1	IAPEYIK	TGRPS	VKTDI	IFGYG	VMLLE	IVTGER	..	AI	FPD	FL	EAGE	IMLI	DQVKLL	MQE	GR	LE	I	LD	NRMDY	YDF	QELAN						
EMJ09226.1	IAPEYIK	TGRPS	VKTDI	IFGYG	VMLLE	IVTGER	..	AI	FPD	FL	EAGE	IMLI	DQVKLL	MQE	GR	LE	I	LD	NRMDY	YDF	QELAN						
SCBAK1	IAPEYIK	TGRPS	VKTDI	IFGYG	VMLLE	IVTGER	AI	AFHPD	RIE	EAGE	IMLI	DQVKL	WMEE	EGRI	LDL	V	DHNL	GGV	YNLEE	LEK							
SCBAK1 S1	IAPEYIK	TGRPS	VKTDI	IFGYG	VMLLE	IVTGER	AI	AFHPD	RIE	EAGE	IMLI	DQVKL	WMEE	EGRI	LDL	V	DHNL	GGV	YNLEE	LEK							
Consensus	a	pey	tg s	td	gyg	lle	vtg r	a				l d vk			l	d n		e									
ABX83681.1	VTQ	IAL	LCTH	ME	NQ	RFT	MSEV	QMLE	GEI	VP	AE	RWE	EWQ	LAEL	QRR	QHE	MR	Q	QKLF	DF	SEES	LN	IQE	AI	EL	STG	
CAB51480.1	VTQ	IAL	LCTH	ME	SQ	RFT	MSEV	QMLE	GEI	VP	AE	RWE	EWQ	LAEL	QRR	QHE	MR	Q	QKLF	DF	SEES	LN	IQE	AI	EL	STG	
ACG24312.1	VTQ	IAL	LCTH	ME	EQ	RFT	MSEV	QMLE	GEI	VP	AE	RWE	EWQ	LAEL	QRR	QHE	MR	Q	QKLF	DF	SEES	LN	IQE	AI	EL	SAG	
XP 004979667.1	IIQ	IAL	LCTH	ME	ED	RFP	MSEV	QMLE	GEI	VP	AE	RWE	EWQ	LAEL	NRR	QY	EM	R	Q	QKPF	DF	SEES	LN	IQE	AI	EL	STG
XP 006663040.1	IIQ	IAL	LCTH	VE	ED	RFP	MSEV	QMLE	GEI	VP	AE	RWE	EWQ	LAEL	NRR	QY	EM	R	Q	QKPF	DF	SEES	LN	IQE	AI	EL	STG
XP 003577373.1	IIQ	IAL	LCTH	ME	ED	RFP	MSEV	QMLE	GEI	VP	AE	RWE	EWQ	LAEL	NRR	QY	EM	R	Q	QKPF	DF	SEES	LN	IQE	AI	EL	STG
EMT13276.1	IIQ	IAL	LCTH	ME	ED	RFP	MSEV	QMLE	GEI	VP	AE	RWE	EWQ	LAEL	NRR	QY	EM	R	Q	QKPF	DF	SEES	LN	IQE	AI	EL	STG
XP 008234117.1	MIK	VAL	LCT	QGS	ED	RFP	MSEV	QMLE	GEI	VP	AE	RWE	EWQ	LAEL	NRR	QY	EM	R	Q	QKPF	DF	SEES	LN	IQE	AI	EL	STG
EMJ09226.1	MIK	VAL	LCT	QGS	ED	RFP	MSEV	QMLE	GEI	VP	AE	RWE	EWQ	LAEL	NRR	QY	EM	R	Q	QKPF	DF	SEES	LN	IQE	AI	EL	STG
SCBAK1	VTQ	IAL	LCTH	ME	NQ	RFT	MSEV	QMLE	GEI	VP	AE	RWE	EWQ	LAEL	QRR	QHE	MR	Q	QKLF	DF	SEES	LN	IQE	AI	EL	STG	
SCBAK1 S1	VTQ	IAL	LCTH	ME	NQ	RFT	MSEV	QMLE	GEI	VP	AE	RWE	EWQ	LAEL	QRR	QHE	MR	Q	QKLF	DF	SEES	LN	IQE	AI	EL	STG	
Consensus		allct		p r											r q e q		f e s		a l s g								

图3 甘蔗ScBAK1/ScBAK1 S1蛋白与其它物种蛋白的氨基酸序列对比。

Fig. 3 Homology analysis of encoding amino acid sequences of ScBAK1/ScBAK1 S1 protein from sugarcane and other plant species.

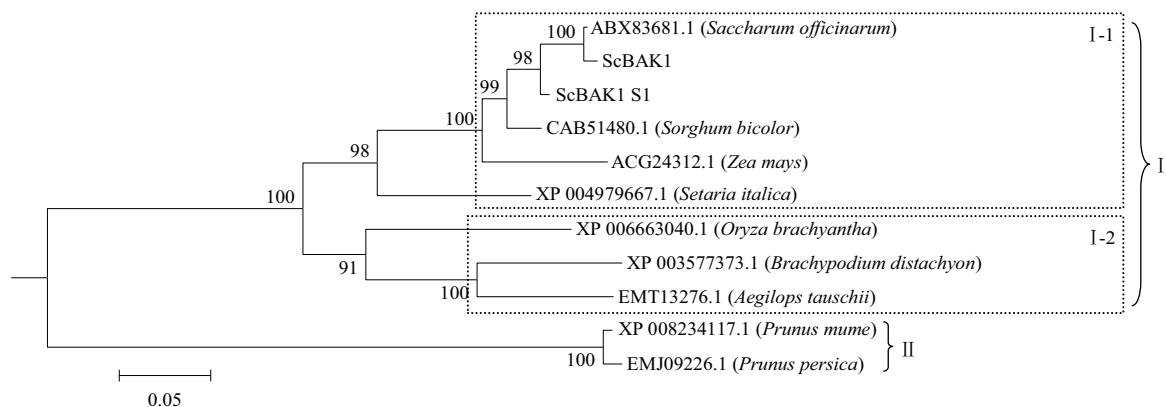


图4 甘蔗ScBAK1/ScBAK1 S1蛋白与其它物种蛋白的进化树分析。

Fig. 4 Phylogenetic analysis of ScBAK1/ScBAK1 S1 protein from sugarcane and other species.

桃两种木本植物属另一大分支(Ⅱ)。其中,在第Ⅰ分支中,同属 C_4 植物的甘蔗、高粱、玉米、小米为一个分支(I-1),而同属 C_3 植物的短花药野生稻、二穗短柄草、节节草为另一个分支(I-2),这表明该蛋白在进化关系较近的植物中具有较强的保守性,而在进化过程中分化较远的植物中差异较大。

2.3 甘蔗*ScBAK1*及*ScBAK1 SI*基因在不同非生物胁迫下的表达特性分析

如图5所示,在非生物胁迫(SA、 $CuCl_2$ 、PEG、ABA、NaCl、JA)下,甘蔗*ScBAK1*基因的表达受SA、 $CuCl_2$ 、PEG和NaCl的诱导,ABA和JA的抑制,而*ScBAK1 SI*基因的表达却在这6种胁迫的各个处理时间点都受到较强烈的抑制,并且较*ScBAK1*基因都急剧下降,但具体的表达特性却又不完全一样。总体看来,在SA、 $CuCl_2$ 和NaCl胁迫下,*ScBAK1*基因上调表达,而*ScBAK1 SI*基因的表达虽然一直处于下调状态,但胁迫

一段时间后,其表达量又有所回升;PEG胁迫下,*ScBAK1*基因在胁迫前期(6 h)处于上调状态,且表达量最高(约为对照组的3.11倍),随着胁迫时间的延长,逐渐转变成下调状态,之后又回升到与对照组相当的状态,而*ScBAK1 SI*基因随着时间的延长,其表达量处于“下降—上升—下降”状态,且在6 h时达到最低(约为对照组的0.012倍);ABA胁迫下,*ScBAK1*基因的表达量随着胁迫时间的延长而逐渐降低,*ScBAK1 SI*基因的表达量在胁迫前期(6 h)急剧下降(约为对照组的0.039倍),随后在稍有回升后又再次下降;JA胁迫下,*ScBAK1*及*ScBAK1 SI*基因的表达都表现出“先下降后上升”的下调趋势,且都在24 h时达到最大。

2.4 甘蔗*ScBAK1*及*ScBAK1 SI*基因在黑穗病胁迫下的表达特性分析

如图6所示,在黑穗病菌胁迫下,甘蔗*ScBAK1*基因的表

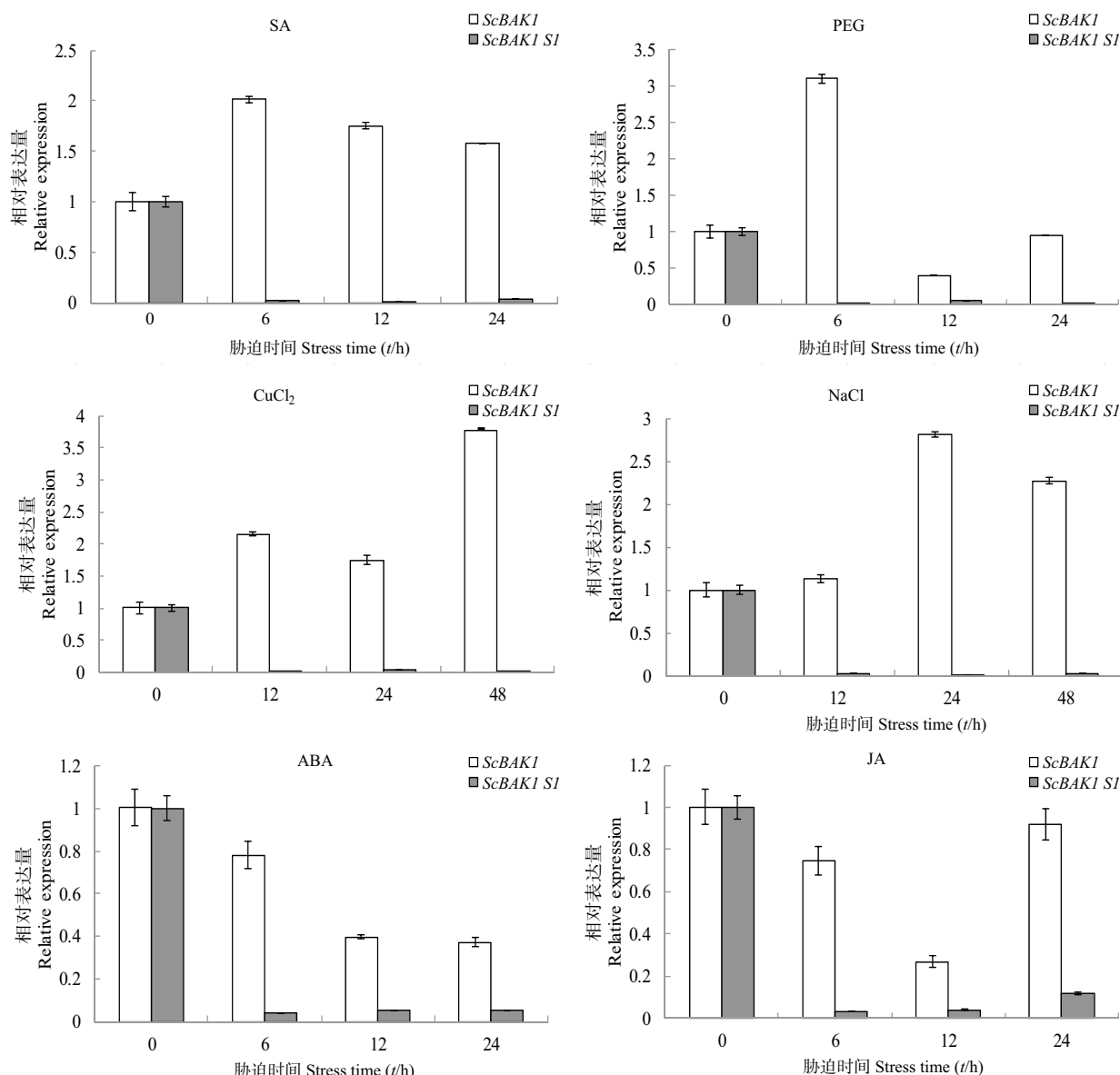


图5 *ScBAK1*和*ScBAK1 SI*基因在不同非生物胁迫下的表达特性。

Fig. 5 Expression profiles of *ScBAK1* and *ScBAK1 SI* gene in various abiotic stresses.

表现出“下降—上升—下降—上升—下降—上升”的波浪型状态,而*ScBAK1* *SI*基因的表达模式在处理前期(12 h、24 h、48 h和72 h)与*ScBAK1*类似,后期(96 h和120 h)却表现出“先上升后下降”的趋势,并且在各处理时间点,*ScBAK1* *SI*基因的表达量较*ScBAK1*基因都有所下降,但具体的表达特性又有所不同。*ScBAK1*基因的表达呈无规则的波浪型,但整体看来又呈现逐步上升的上调趋势;*ScBAK1* *SI*基因在各处理时间点的表达均呈下调趋势,并且表达量水平变化较小,趋向于稳定。

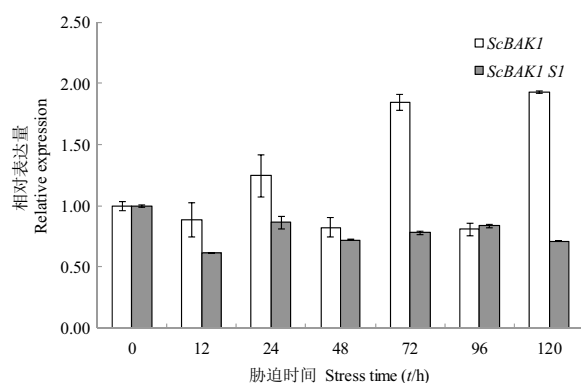


图6 *ScBAK1*和*ScBAK1 SI*基因在黑穗病菌胁迫下的表达特性。

Fig. 6 Expression profiles of *ScBAK1* and *ScBAK1 SI* gene in smut fungus stress.

3 讨论

油菜素内酯不敏感受体激酶1 (BAK1) 是植物中丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的一种,在植物的生长发育及先天免疫反应中发挥重要的作用^[3]。本研究以甘蔗品种YC05-179叶片的cDNA为材料,成功克隆到1条甘蔗*ScBAK1*基因及该基因的可变剪接体,即*ScBAK1 SI*。序列比对显示,RT-PCR扩增获得的*ScBAK1/ScBAK1 SI*碱基序列与电子克隆得到的cDNA序列相似度达97.96%/93.55%,且*ScBAK1/ScBAK1 SI*蛋白氨基酸序列与Vicentini等人发现的蛋白^[16]相似度达97.42%/92.08%,这进一步的说明克隆到的*ScBAK1*及*ScBAK1 SI*基因序列的正确性。生物信息学分析显示,*ScBAK1/ScBAK1 SI*蛋白中均存在信号肽,定位于质膜上,为脂溶性的分泌性酸性蛋白,这与Vicentini等人发现的*ScBAK1*蛋白^[16]相同,此外,*ScBAK1 SI*蛋白中部分氨基酸的缺失并未造成*ScBAK1*蛋白移码突变,这些都在一定程度上说明这种剪接方式对甘蔗*ScBAK1*基因编码蛋白的一级结构及理化性质影响不大。氨基酸同源性分析显示,该蛋白在同源进化关系较近的植物中其保守性较强。此外,节节草富含亮氨酸重复序列的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (EMT13276.1) 在其172和173个氨基酸残基之间有很大的间隙,可能是由于该基因在该区段表达时也存在选择性剪接,也可能是进化过程中物种的自然选择造成的,推测甘蔗*ScBAK1*基因为适应自然进化或生物胁迫产生选择性剪切。

可变剪接在植物体内是普遍存在的,能够通过改变转录组可塑性来提高植物的抗逆性^[30],有效帮助植物适应生物和非生物逆境,被广泛应用于植物生长发育、信号转导以及

逆境胁迫应答研究中^[31]。可变剪接将生物遗传信息在更高层次上进行重新组合,使机体产生更多种类的蛋白质,在长期的生物进化过程中,经过优胜劣汰的选择,生物体会保留对其自身有益的剪接方式^[32]。前人研究表明,干旱应答元件结合蛋白质/C-重复序列结合子 (Dehydration responsive element binding protein/C-repeat binding factor, DREB/CBF) 类转录因子能够在盐分、温度和干旱等环境胁迫下发生可变剪接,帮助小麦、水稻和玉米适应上述逆境带来的组织脱水^[33-35];拟南芥禽成髓细胞瘤病毒致癌基因同源物类基因 (*v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog 59 gene*, *AtMYB59*) 的一个剪接变体在多种胁迫条件下被表达,通过转录调控形式来适应多种逆境条件^[36];水稻促分裂原活化蛋白激酶基因 (*Blastand wound induced mitogen-activated protein kinase 1 gene*, *OsBWMK1*) 的3个可变剪接体 (*OsBWMK1L*、*OsBWMK1M*和*OsBWMK1S*) 表现出不同的亚细胞定位,进而可通过亚细胞定位的改变影响其蛋白功能^[37];棉花体细胞胚胎发生受体类激酶1的类似物 (*Somatic embryogenesis receptor-like kinase1-like*, *GhSERKL1*) 基因的2个可变剪接处的内含子在剪接过程中具有竞争的受体5'端剪接位点,而3'端的供体位点相同^[38]。*BAK1*蛋白在与各种受体形成复合物的过程中,使底物磷酸化来启动植物的免疫反应等,进而调节植物生长、发育,但这种磷酸化反应依赖其激酶活性^[13, 39-40]。根据甘蔗*ScBAK1*蛋白的结构图 (图2) 和Vicentini的报道^[16],本研究中发现的*ScBAK1 SI*蛋白中缺失的部分正位于*ScBAK1*蛋白的细胞质激酶区域,使具有酪氨酸激酶催化活性的C-端部分缺失,故推测甘蔗*ScBAK1*基因的此种剪接方式在*ScBAK1*蛋白与多种组分互作的过程中发挥着一定的作用。

*BAK1*是一个多功能受体,与多个互作组分相互作用共同调控植物的生长发育及对多种病原的抗性。前人研究表明,SA为植物的次生代谢产物,参与植物对病原的防御反应,进而诱导植物系统获得性抗性^[41-42];NaCl和PEG为渗透胁迫物质,且NaCl对植物有Na⁺毒害效应^[43-44];Cu²⁺胁迫抑制细胞的呼吸作用进而抑制细胞的生长,会对细胞膜造成伤害^[45]。本研究中荧光定量PCR分析显示,非生物胁迫 (SA、CuCl₂、PEG、ABA、NaCl、JA) 下,*ScBAK1*基因的表达受SA、CuCl₂、PEG和NaCl的诱导,ABA和JA的抑制,而*ScBAK1 SI*基因的表达却均受到抑制;生物胁迫 (黑穗病菌) 胁迫下,虽然甘蔗*ScBAK1*基因和*ScBAK1 SI*基因的表达无规律性,但就整体而言,甘蔗*ScBAK1*基因呈现上调表达趋势,*ScBAK1 SI*基因呈下调表达,推测这种无规律性可能是由植株间基因本底水平表达量的差异或取样差异引起的。因此,本研究表明*ScBAK1 SI*以负调控的方式参与甘蔗对多种外源非生物及黑穗病菌胁迫的响应过程,推测*ScBAK1 SI*基因中片段的缺失在*ScBAK1*参与甘蔗对黑穗病菌的抗性方面、渗透胁迫方面以及细胞生长方面等发挥着较为重要的作用。此外,*ScBAK1 SI*基因的表达量较*ScBAK1*基因急剧降低,尤其是非生物胁迫,表明在特定条件下,*ScBAK1*基因和*ScBAK1 SI*基因的表达有选择性。

前人研究表明,mRNA编码区与mRNA的稳定性有密切的联系^[46]。编码区的变化可以使mRNA的结构发生改

变^[47], 而mRNA二级结构的改变可能对基因的转录、翻译及mRNA的稳定性有一定的影响^[48]。本研究所有外源胁迫下, *ScBAK1* *SI*都下调表达, 可能是因为部分缺失使其mRNA的二级结构发生变化, 从而导致该mRNA的稳定性下降, 以至于同*ScBAK1*相比, 在表达模式上产生较大差异。可变剪接发生在mRNA转录的过程中。在Pre-mRNA的剪接过程中, 不同的剪接因子识别不同外显子和内含子交界处的剪接位点形成剪接复合体, 调控剪接的发生^[49-51]。SR蛋白和hnRNP蛋白是目前研究最广的蛋白剪接因子, 但SR蛋白与hnRNP蛋白在参与Pre-mRNA剪接的过程中存在拮抗作用^[52], 即SR蛋白结合剪接增强子在近端剪接位点剪切选择性外显子, 而hnRNP蛋白则结合到剪接沉默子上抑制远端剪接位点处的剪切^[53]。此外, 特异性的转录因子^[54]及RNA的二级结构的影响^[55]等也会对可变剪接起调控作用。根据序列比对信息, 本研究中所得到的*ScBAK1* *SI*序列和*ScBAK1*同源性极高, 但却表现出了两种截然不同的表达情况, 推测这种表达差异可能取决于特定的转录调控因子^[56] (如剪接因子或转录因子等), 从而表现出不同的转录水平。

参考文献 [References]

- 冯蕾. 水稻*OsRLK824*基因的表达特性与功能分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012 [Feng L. The expression characteristics and functional analysis of *OsRLK824* in rice [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012]
- Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schmidt Ed DL, Boutilier K, Grossniklaus U, Vries SC. 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
- 田荣, 杨勇, 王晓峰. 植物受体激酶BAK1研究进展[J]. 西北植物学报, 2014, **34** (3): 636-644 [Tian R, Yang Y, Wang XF. Research progress on BAK1 of a receptor kinase [J]. *Acta Bot Bor-Occid Sin*, 2014, **34** (3): 636-644]
- Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC. BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling [J]. *Cell*, 2002, **110** (2): 213-222
- Morris ER, Walkery JC. Receptor-like protein kinases: the keys to response [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, **6** (4): 339-342
- Shan LB, He P, Li JM, Heese A, Peck SC, Nürnberger T, Martin GB, Sheen J. Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity [J]. *Cell Host Microbe*, 2008, **4** (1): 17-27
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response [J]. *Cell*, 2006, **124** (4): 803-814
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence [J]. *Nature*, 2007, **448** (7152): 497-500
- Chinchilla D, Shan LB, He P, de Vries S, Kemmerling B. One for all: the receptor-associated kinase BAK1 [J]. *Trends Plant Sci*, 2009, **14** (10): 535-541
- Wang Z, Meng P, Zhang XY, Ren DT, Yang SH. BON1 interacts with the protein kinases BIR1 and BAK1 in modulation of temperature-dependent plant growth and cell death in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2011, **67** (6): 1081-1093
- Lu DP, Wu SJ, Gao XQ, Zhang YL, Shan LB, He P. A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2010, **107** (1): 496-501
- Wang L, Xu YY, Li J, Powell RA, Xu ZH, Chong K. Transgenic rice plants ectopically expressing AtBAK1 are semi-dwarfed and hypersensitive to 24-epibrassinolide [J]. *J Plant Physiol*, 2007, **164** (5): 655-664
- Yang DH, Hettnerhausen C, Baldwin IT, Wu JQ. The multifaceted function of BAK1/SERK3: Plant immunity to pathogens and responses 1 to insect herbivores [J]. *Plant Signal Behav*, 2011, **6** (9): 1322-1324
- Chaparro-Garcia A, Wilkinson RC, Gimenez-Ibanez S, Findlay K, Coffey MD, Zipfel C, Rathjen JP, Kamoun S, Schornack S. 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
- 杨辉, 闽东波, 黄吉, 唐亮, 黄云. 拟南芥BAK1基因转化及防御作用[J]. 生物技术通报, 2012, **8**: 71-75 [Yang H, Min DT, Huang J, Tang L, Huang Y. Transformation and the defense role of BAK1 in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biotechnol Bull*, 2012, **8**: 71-75]
- Vicentini R, Felix JD, Dornelas MC, Menossi M. Characterization of a sugarcane (*Saccharum* spp.) gene homolog to the brassinosteroid insensitive1-associated receptor kinase 1 that is associated to sugar content [J]. *Plant Cell Rep*, 2009, **28** (3): 481-491
- 闻芳, 李衍达. 基因表达调控与选择性剪接机制研究[J]. 电子学报, 2001, **29** (12A): 1735-1739 [Wen F, Li YD. A bioinformatic analysis of alternatively spliced genes of human [J]. *Acta Electron Sin*, 2001, **29** (12A): 1735-1739]
- 李稚锋, 王正志, 张成岗. 真核基因可变剪接研究现状与展望[J]. 生物信息学, 2004, **2** (2): 35-38 [Li ZF, Wang ZZ, Zhang CG. Current progress on alternative pre-mRNA splicing research in eukaryote genes [J]. *China J Bioinformatics*, 2004, **2** (2): 35-38]
- 邱莫寒, 俞宁. RNA的可变剪接[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, **31** (5): 13-14 [QiU MH, Yu N. Alternative RNA splicing [J]. *Anim Husbandry Feed Sci*, 2010, **31** (5): 13-14]
- Harrison PM, Kumar A, Lang N, Snyder M, Gerstein M. A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30** (5): 1083-1090
- Roberts GC, Smith CWJ. Alternative splicing: combinatorial output from the genome [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2002, **6** (3): 375-383
- Grabowski PJ, Black DL. Alternative RNA splicing in the nervous system [J]. *Prog Neurobiol*, 2001, **65** (3): 289-308
- Lopez AJ. Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanism of regulation [J]. *Ann Rev Genet*, 1998, **32** (1): 279-305
- 肖新换, 黄宁, 张玉叶, 杨宗锋, 凌辉, 黄琬, 苏炜华, 阙友雄. 甘蔗光合系统I亚基O基因的克隆与表达分析[J]. 应用与环境生物学报, 2015, **21** (2): 208-214 [Xiao XH, Huang N, Zhang YY, Yang ZF, Ling H, Huang L, Su WH, Que YX. Cloning and expression of photosystem I subunit O gene from sugarcane [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2015, **21** (2): 208-214]
- Que YX, Xu LP, Wu QB, Liu YF, Ling H, Liu YH, Zhang YY, Guo JL, Su YC, Chen JB, Wang SS, Zhang CG. Genome sequencing of *Sporisorium scitamineum* provides insights into the pathogenic mechanisms of sugarcane smut [J]. *BMC Genomics*, 2014, **15** (1): 996
- Ling H, Wu QB, Guo JL, Xu LP, Que YX. Comprehensive selection of reference genes for gene expression normalization in sugarcane by real

- time quantitative RT-PCR [J]. *PLoS ONE*, 2014, **9** (5): e97469
- 27 Linak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25** (4): 402-408
 - 28 阙友雄, 许莉萍, 林剑伟, 陈如凯. 甘蔗NBS-LRR类抗病基因同源序列的分离与鉴定[J]. 作物学报, 2009, **35** (4): 631-639 [Que YX, Xu LP, Lin JW, Chen RK. Isolation and characterization of NBS-LRR resistance gene analogs from sugarcane [J]. *Acta Agron Sin*, 2009, **35** (4): 631-639]
 - 29 纪冬, 辛绍杰. 实时荧光定量PCR的发展和数据分析[J]. 生物技术通讯, 2009, **20** (4): 598-600 [Ji Dong, Xin SJ. Development and data analysis of real-time fluorescent quantitative PCR [J]. *Biotechnol Bull*, 2009, **20** (4): 598-600]
 - 30 李娇. 玉米苗期干旱胁迫下可变剪接及其调控因子的研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2013 [Li J. Analysis of alternative splicing in whole transcriptome and its regulator SR protein under drought stress in seed of *Zea mays* L. [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2013]
 - 31 Carvalho RF, Feijao CV, Duque P. On the physiological significance of alternative splicing events in higher plants [J]. *Protoplasma*, 2012, **250** (3): 639-650
 - 32 宋喜梅. 甘蔗SPS家族基因表达分析及SPSⅢ可变剪接的研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2010 [Song XM. Expression analysis of SPS gene families and study on alternative splicing of SPSⅢ from *Saccharum officinarum* [D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2010]
 - 33 Egawa C, Kobayashi F, Ishibashi M, Nakamura T, Nakamura C, Takumi S. Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a DREB2 homolog under abiotic stress conditions in common wheat [J]. *Genes Genet Syst*, 2006, **81** (2): 77-91
 - 34 Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Tran LSP, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. [J]. *Plant J*, 2007, **50** (1): 54-69
 - 35 Matsukura S, Mizoi J, Yoshida T, Todaka D, Ito Y, Maruyama K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes [J]. *Mol Genet Genomics*, 2010, **283** (2): 185-196
 - 36 Li J, Li X, Guo L, Lu F, Feng XJ, He K, Wei LP, Chen ZL, Qu LJ, Gu HY. A subgroup of MYB transcription factor genes undergoes highly conserved alternative splicing in *Arabidopsis* and rice [J]. *J Exp Bot*, 2006, **57** (6): 1263-1273
 - 37 Koo SC, Yoon HW, Kim CY, Moon BC, Cheong YH, Han HJ, Lee SM, Kang KY, Kim MC, Lee SY, Chung WS, Cho MJ. Alternative splicing of the *OsBWMK1* gene generates three transcript variants showing differential subcellular localizations [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **360** (1): 188-193
 - 38 林芹. 棉花GhSERKs基因的克隆及表达分析[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2012 [Lin Q. The cloning and expression analysis of GhSERKs gene from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2012]
 - 39 Heese A, Hann DR, Gimenez-Ibanez S, Jones AME, He K, Li J, Schroeder JI, Peck SC, Rathjen JP. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2007, **104** (29): 12217-12222
 - 40 Lu DP, Lin WW, Gao XQ, Wu SJ, Cheng C, Avila J, Heese A, Devarenne TP, He P, Shan LB. Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity [J]. *Science*, 2011, **332** (6036): 1439-1442
 - 41 饶力群, 官春云, 罗泽民. 过氧化氢、水杨酸与植物抗病性关系的研究进展[J]. 湖南农业大学学报, 2000, **26** (1): 9-14 [Rao LQ, Guan CY, Luo ZM. Hydrogen peroxide, salicylic acid and plant disease resistance [J]. *J Hunan Agric Univ*, 2000, **26** (1): 9-14]
 - 42 Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditz-Jawhar R, Ward E, Uknes S, Kessmann H, Ryals J. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction [J]. *Plant Cell*, 1994, **6** (7): 959-965
 - 43 刘正鲁, 朱月林, 魏国平, 杨立飞, 张古文, 胡春梅. NaCl胁迫对茄子嫁接苗叶片多胺代谢和ABA含量的影响[J]. 生态学报, 2008, **28** (4): 1586-1592 [Liu ZL, Zhu YL, Wei GP, Yang LF, Zhang GW, Hu CM. Effects of NaCl stress on metabolism of polyamines and ABA content in leaves of grafted eggplants [J]. *Acta Ecol Sin*, 2008, **28** (4): 1586-1592]
 - 44 Jia GL, Dai HP, Feng BL, Zhang SQ, Zhang SW. Biochemical characteristics in Broomcorn Millet (*Panicum miliaceum* L.) seedlings under PEG simulated drought stress [J]. *Acta Bot Bor-Occid Sin*, 2008, **28** (10): 2073-2079
 - 45 孙学娟, 刘美君, 高辉远, 杨程, 张子山, 孟庆伟. CuCl₂胁迫对烟草BY-2悬浮细胞死亡的诱导[J]. 植物生理学报, 2012, **48** (2): 173-180 [Sun XJ, Liu MJ, Gao HY, Yang C, Zhang ZS, Meng QW. Cell death induced by CuCl₂ stress in tobacco BY-2 cells [J]. *J Plant Physiol*, 2012, **48** (2): 173-180]
 - 46 Drapier D, Girard-Bascou J, Stern DB, Wollman FA. A dominant nuclear mutation in *Chlamydomonas* identifies a factor controlling chloroplast mRNA stability by acting on the coding region of the atpA transcript [J]. *Plant J*, 2002, **31** (6): 687-697
 - 47 熊高飞, 熊向阳, 张吉翔. mRNA结构及其稳定性的关系[J]. 细胞生物学杂志, 2006, **28** (4): 513-517 [Xiong GF, Xiong XY, Zhang JX. The relationship between mRNA structure and its stability [J]. *Chin J Cell Biol*, 2006, **28** (4): 513-517]
 - 48 Geissmann T, Marzi S, Romby P. The role of mRNA structure in translational control in bacteria [J]. *RNA Biol*, 2009, **6** (2): 153-160
 - 49 Smith CWJ, Valcárcel J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control [J]. *Trends Biochem Sci*, 2000, **25** (8): 381-388
 - 50 Srebrow A, Kornbliht AR. The connection between splicing and cancer [J]. *J Cell Sci*, 2006, **119** (13): 2635-2641
 - 51 Patton JG, Mayer SA, Tempst P, Nadal-Ginard B. Characterization and molecular cloning of polypyrimidine tract-binding protein: a component of a complex necessary for pre-mRNA splicing [J]. *Genes Dev*, 1991, **5** (7): 1237-1251
 - 52 Singh R, Valcárcel J, Green MR. Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding proteins [J]. *Science*, 1995, **268** (5214): 1173-1176
 - 53 Ladd AN, Cooper TA. Finding signals that regulate alternative splicing in the post-genomic era [J]. *Genome Biol*, 2002, **3** (11): 1-16
 - 54 Kornbliht AR, de la Mata M, Fededa JP, Munoz MJ, Nogues G. Multiple links between transcription and splicing [J]. *RNA*, 2004, **10** (10): 1489-1498
 - 55 Shepard PJ, Hertel KJ. Conserved RNA secondary structures promote alternative splicing [J]. *RNA*, 2008, **14** (8): 1463-1469
 - 56 陈志宏, 傅梅萍, 李远峰, 陶永新, 江玉姬, 谢宝贵. 草菇6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶基因可变剪接体克隆与表达分析[J]. 应用与环境生物学报, 2014, **20** (4): 584-589 [Chen ZH, Fu MP, Li YF, Tao YX, Jiang YJ, Xie BG. Cloning and expression of 6-phosphogluconate dehydrogenase alternative splicing in *Volvariella volvacea* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2014, **20** (4): 584-589]