

龙眼 *TMK* 基因家族成员的全基因组鉴定及表达分析

苏炳茜, 张舒婷, 刘浦东, 李晓斐, 戚峰, 林玉玲, 赖钟雄*

(福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福州 350002)

摘要:【目的】更全面地解析龙眼 *TMK* 基因家族的生物学特性及其在龙眼体胚发生早期及不同激素处理下的表达模式。【方法】利用多种生物信息学分析软件预测 *DlTMK* 基因家族成员编码的蛋白基本理化性质、染色体定位、系统进化树、基因结构、启动子顺式作用元件等, 并采用实时荧光定量 PCR((quantitative real-time PCR, qRT-PCR)技术检测 *DlTMK* 在龙眼体胚发生早期 3 个阶段及在不同激素处理下的表达模式。【结果】共筛选出 6 个 *DlTMK* 基因家族成员, 其编码的蛋白质均为具有跨膜结构不具有信号肽的亲水性蛋白, 主要定位在质膜、细胞质和细胞核上。染色体定位结果显示, *DlTMK* 基因家族存在串联重复序列。*DlTMK* 基因家族在进化方式上与拟南芥、杨树相近。启动子顺式作用元件分析表明, *DlTMK* 基因家族成员启动子中含有多种激素响应、逆境响应及光响应元件。qRT-PCR 结果显示, *DlTMK* 基因家族大多数成员在龙眼体胚发生早期各阶段的表达量变化趋势与转录组分析结果基本一致, 但不同成员的表达模式存在差异, 并且 *DlTMK* 基因家族各成员均响应生长素(auxin, IAA)、脱落酸(abscisic acid, ABA)及赤霉素(gibberellic acid, GA₃)。【结论】*DlTMK* 基因家族在进化上具有高度保守性, 参与多种激素应答, 通过推测发现可能以磷酸化的方式参与激素信号传递, 调控龙眼体胚发育。

关键词: 龙眼; 跨膜激酶; 体细胞胚胎; 激素; 表达模式

中图分类号: S667.12

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2021)10-1668-13

Genome-wide identification and expression analysis of *TMK* gene family in *Dimocarpus longan* Lour.

SU Bingxi, ZHANG Shuting, LIU Pudong, LI Xiaofei, QI Feng, LIN Yuling, LAI Zhongxiong*

(Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China)

Abstract: 【Objective】Transmembrane kinases (TMK) belong to a small subfamily of receptor-like protein kinases (RLKs). They participate in auxin signal transduction pathway on cell membrane and mainly control the cell expansion and proliferation and the downstream signals of auxin. *Dimocarpus longan* Lour. is one of the important economic crops in Sapindaceae, and its embryo development is closely related to fruit quality. Endogenous hormones play a vital regulatory role in the embryo developmental process, and auxin can promote the early somatic embryo development of longan. Longan embryos have a highly heterozygous genetic background and are difficult to obtain. Therefore, it is not easy to use molecular biology methods for researching. Based on the high similarity of the developmental process between longan somatic embryos and zygotic embryos, Lai established a stable, efficient and capable of regeneration longan somatic embryogenesis system for researching the molecular biology in longan. At present, the *TMK* genes have been studied only in a few plants, and there is no report in longan. The research was carried out to comprehensively analyze the biological characteristics of longan *TMK* gene family, the expression patterns during the early embryogenesis of longan and when treated with different kinds and concentrations of hormones, and provide a reference for the study of auxin signaling pathway during the somatic embryogenesis of longan. 【Methods】Four AtTMK amino acid se-

收稿日期: 2021-04-25 接受日期: 2021-06-21

基金项目: 国家自然科学基金(31572088、31672127); 福建省高原学科建设经费(102/71201801101); 福建农林大学科技创新专项基金(CXZX2017189、CXZX2017314、CXZX2018076、KF2015108)

作者简介: 苏炳茜, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为果树生物技术。Tel: 15396073136, E-mail: 664281099@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13906933317, E-mail: Laizx01@163.com

quences were used as probe sequences, and a variety of bioinformatics software were used for screening. In the end, we obtained 6 *DlTMK* genes with complete conservative domains. A variety of bioinformatics related software were used to analyze and predict the gene structure, basic physicochemical property, transmembrane domain, subcellular location, chromosome location, phosphorylation site, phylogenetic tree, *cis*-acting elements and the transcriptome data of the *DlTMK* gene family members. The possibility of *DlTMK* family members responding to multiple hormones were explored by analyzing the expression patterns of the genes under different hormone treatments. 【Results】A total of 6 *DlTMK* family members were screened, all of them have a transmembrane structure with no signal peptide, and they are macromolecular hydrophilic proteins. According to the subcellular localization prediction results, the *DlTMK* gene family are mainly located in the cytoplasm, plasma membrane and nucleus. Phosphorylation site prediction analysis showed that phosphorylation mainly occurs on the serine and threonine sites, and serine was the main phosphorylation site. Each member has a simple structure with one intron and two exons, as well as 13 highly conserved motifs and 4-7 LRR repeats. Chromosome mapping results showed that 6 *DlTMK* members are randomly distributed on 5 chromosomes, and the *DlTMK1-1* and *DlTMK1-2* are tandem repeats. The homologous relationship between *DlTMK* gene family and *Arabidopsis thaliana* and poplar were closed, we speculated that they would have similar evolutionary mode. The promoter *cis*-acting elements of *DlTMK* family members mainly contain three hormone response elements: auxin (IAA), abscisic acid (ABA) and gibberellin (GA3) responsive elements. All members contain light responsive elements, 5 members have anaerobic induction responsive elements, and a few members have methyl jasmonate (MeJA) response, salicylic acid (SA) response, low temperature stress, circadian control, zein metabolism and meristem responsive elements. The differences types and numbers of *cis*-acting elements among different members indicated that their biological functions are different. The expression trends of *DlTMK* family members during the early somatic embryogenesis of longan was basically consistent with the results of transcriptome analysis. The transcriptome change trend of *DlTMK1-1*, *DlTMK1-3* and *DlTMK4* was the same as the actual detection results. The expression of Incomplete embryotic compact structure (ICpEC) of *DlTMK1-2* and *DlTMK3-1* in transcriptome was higher than that of embryogenic callus (EC), but it was found that the expression in this stage was slightly lower than that in EC stage. The expression of *DlTMK3-2* in ICpEC stage was the lowest among the three stages, which was opposite to that in transcriptome data and might be caused by sequencing error. All *DlTMK* family members responded to IAA, ABA and GA3 hormones. Under the IAA treatment, the *DlTMK1-1* and *DlTMK1-3* showed a "W" shape expression trend. *DlTMK1-2*, *DlTMK3-1* and *DlTMK4* expressed highly first and then decreased, and reached the peak on the 6th day. *DlTMK3-2* showed a down-regulation trend at first and then up-regulation during the 0th day to the 6th day, and a significant downward trend from the 6th day to the 12th day. Under the ABA treatment, the expression of every two *DlTMK* members had the same trend. For example, *DlTMK1-1* and *DlTMK1-2* showed a "M" expression shape and reached peak on the 9th day, while *DlTMK1-3* and *DlTMK3-2* were significantly decreased on the 3rd day, then increased gradually, and reached the peak on the 9th day, and decreased significantly again on the 12th day. The expression of *DlTMK3-1* and *DlTMK4* increased at first and then decreased, *DlTMK3-1* reached the peak on the 6th day and *DlTMK4* reached the peak on the 9th day. Under the GA3 treatment, the expression of *DlTMK1-1* and *DlTMK3-2* had no significant change from the 0th day to the 6th day, but the expression of *DlTMK1-1* decreased gradually from the 6th day to the 12th day, and the expression of *DlTMK3-2* decreased significantly and then increased significantly from the 6th day to the 12th day. Both *DlTMK3-1* and *DlTMK4* reached the ex-

pression peak on the 3rd day. The expression of DITMK1-2 and DITMK1-3 showed opposite expression trends: DITMK1-2 was significantly up-regulated on the 3rd day, down-regulated from the 3rd day to the 9th day, and increased on the 12th day, but not significantly different on the 9th day. DITMK1-3 was significantly down-regulated on the 3rd day, and up-regulated from the 3rd day to the 9th day, and significantly down-regulated on the 12th day. In addition, the expression trends of the same gene with different treatments were similar. 【Conclusion】This study showed that the DITMK family members are highly conservative in evolutionary characteristics and they might participate in a variety of hormone responses. According to the mode of action of RLKs and TMK gene families in other plants, we speculated that DITMK gene families would be also involved in hormone signal transduction through reversible phosphorylation and regulate longan somatic embryogenesis.

Key words: *Dimocarpus longan* Lour.; Transmembrane kinases; Somatic embryo; Hormone; Expression pattern

跨膜激酶(transmembrane kinases, TMK)属于类受体蛋白激酶家族(receptor-like protein kinase, RLKs)中的1个小亚族,最早是在寻找拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)乙烯受体基因时偶然发现的,由定位在细胞膜上的4个成员组成,分别是AtTMK1、AtTMK2、AtTMK3及AtTMK4^[1-2]。AtTMK基因家族成员编码的蛋白拥有3个不同的结构域,分别是胞外结构域、跨膜结构域及胞内结构域,其中胞外结构域具有富含亮氨酸的受体激酶(leucine-rich repeat, LRR)重复序列,胞内结构域则具有丝氨酸与苏氨酸激酶活性。此外,AtTMK基因家族每个成员在胞内激酶结构域上含有1个独特的内含子^[3-4]。

研究发现,TMK基因家族参与细胞膜上生长素(auxin, IAA)信号转导通路,主要调控植物细胞的扩张和IAA下游信号的调控^[5-7]。此前在IAA信号转导通路中研究最深入的1条是IAA受体蛋白(transport inhibitor response 1/auxin signaling F-box protein, TIR1/AFB)与经典的IAA响应蛋白(auxin/in-dole-3-Acetic Acid, AUX/IAA)结合形成蛋白复合体,促进AUX/IAA转录抑制因子泛素化降解,激活IAA响应因子(auxin response factor, ARF),从而调控下游基因表达^[8-10]。但是,此信号转导通路无法解释IAA的全部功能,如IAA如何调节植物细胞的极性生长等。Cao等^[11]在拟南芥中发现了新的IAA信号转导机制IAA-TMK1,该通路与TIR1/AFB信号通路共享部分转录因子,2条信号转导通路相互配合,协同调控植物生长。IAA-AtTMK1信号通路起源于细胞表面,高浓度IAA可使AtTMK1羧基末端裂解并转入细胞核内,与核内AUX / IAA家族中的2个非经典转录抑制因子IAA32和IAA34特异性结

合,并使其磷酸化,最终调节ARF转录因子,调控下游基因,由此解析了植物顶端弯钩发育过程中由于内外侧细胞IAA水平不同导致的差异性生长。此外, TMK基因家族编码的蛋白还参与IAA非转录水平上的调控机制^[12]。如AtTMK1与AtTMK4可与丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族中的MKK4与MKK5特异性结合并使其磷酸化,调控拟南芥侧根发育过程中的细胞分裂模式^[7],还可通过在细胞表面可逆地抑制TMK1信号转导途径,调节植物根系的生长^[13]。部分IAA可通过TMK4诱导IAA合成关键酶TAA1(tryptophan aminotransferase of arabidopsis 1)的苏氨酸101位点磷酸化,抑制IAA的合成,从而维持IAA浓度稳定,调控根系发育^[14]。Xu等^[15]发现IAA结合蛋白(auxin binding protein 1, ABP1)可与AtTMK1的胞外结构域相互作用,形成细胞膜表面IAA受体复合体,进而介导IAA信号由细胞外向细胞内部传递。同时,可通过调控IAA浓度来调节ABP1与AtTMK1形成的细胞表面受体复合体,从而快速激活胞内小G蛋白(rho-related GTPase of plant, ROP)中的ROP2与ROP6,并分别激活下游效应蛋白(ROP-interactive CRIB motif - containing proteins, RICs)中的RIC1、RIC4,最终调控细胞骨架的动态变化及叶表皮铺板细胞的形态建成^[16]。

龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)是无患子科(Sapindaceae)龙眼属(*Dimocarpus* Lour.)中重要的亚热带木本植物,具有较高的经济及药用价值^[17-19]。龙眼果实产量及品质与胚胎发育情况密切相关,而在胚胎发育过程中,内源激素发挥着至关重要的调节作用,且IAA能够促进龙眼胚胎早期的发育^[20]。

由于龙眼胚胎高度杂合的遗传背景且取材困难,不易采用分子生物学手段进行研究,陈裕坤等^[21]和赖钟雄^[22]根据龙眼体胚与胚胎发育过程极其相似的特征,建立了稳定、高效、再生能力强的龙眼体胚发生系统。截至目前,关于植物TMK基因家族在IAA信号转导通路中的研究仅在拟南芥、水稻^[23]、烟草^[2]及莴苣^[24]4种植物中有报道,而在龙眼中的研究尚未见报道。因此,笔者基于本实验室建立的龙眼全基因组数据库^[25],通过分析DITMK基因家族各成员的基因结构、蛋白理化性质、跨膜结构、亚细胞定位、染色体定位、磷酸化位点、系统进化树、顺式作用元件及转录组数据,预测DITMK基因家族扩张动力及进化特性;通过分析不同激素处理下的表达模式,探索DITMK基因家族成员响应多种激素的可能性,以期为研究龙眼体胚发生过程中IAA信号转导通路的分子机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

在本试验中使用福建农林大学园艺植物生物工程研究所赖钟雄科研团队提供的龙眼3代基因组数据库及龙眼转录组数据库(待发表)进行分析,初始试验材料为福建农林大学园艺植物生物工程研究所赖钟雄^[22]建立的红核子龙眼胚性愈伤组织(embryogenic callus, EC),并以此诱导出不完全紧实结构(incomplete embryotic compact structure, ICpEC)及球形胚(globular embryo, GE)材料,培养方法参照赖钟雄^[22]建立的培养体系。取0.2 g长势良好的龙眼EC材料接种于添加IAA 1.5 mg·L⁻¹、赤霉素(gibberellin acid, GA₃) 9 mg·L⁻¹及脱落酸(abscisic acid, ABA) 9 mg·L⁻¹的MS培养基中,在25 °C无菌黑暗环境中培养0、3、6、9、12 d后,取样保存于-80 °C冰箱中。

1.2 龙眼TMK基因家族成员鉴定

根据文献中拟南芥TMK基因家族的登录号^[5],在拟南芥基因组数据库TAIR(<https://www.arabidopsis.org/Blast/>)下载得到4条TMK基因序列作为探针序列,将龙眼3代基因组数据库与其进行同源性比对,得到10条候选的DITMK基因序列。利用在线软件HMMER(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>)及Pfam(<http://pfam.xfam.org/search>)进行保守结构域对比分析,通过InterPro([\[terpro\]\(#\)\)分析胞内及胞外结构域,删去2条不具有对应结构域的基因,使用DNAMAN6.0比对基因之间的相似度,去除2条重复基因。采用NCBI\(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>\)及TAIR进行blast比对,最终获得6条具有完整结构域的DITMK基因序列,参照拟南芥TMK基因家族4个成员命名方法,对6个DITMK基因家族成员进行命名。](http://www.ebi.ac.uk/in-</p></div><div data-bbox=)

1.3 龙眼TMK基因家族生物信息学分析

使用ExPasy protparam(<https://web.expasy.org/protparam/>)在线软件分析DITMK基因家族编码的DITMKs的蛋白理化性质;通过SignalP 4.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>)在线软件对DITMKs信号肽进行预测分析;利用TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)在线软件预测分析DITMKs跨膜结构;使用CELLO(<http://cello.life.nctu.edu.tw/>)在线软件预测DITMKs蛋白亚细胞定位;使用NetPhos 3.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)在线软件预测分析DITMKs蛋白质磷酸化位点。使用TBtools^[26]软件中Show Gene On Chromosome功能绘制染色体定位图。通过水稻基因组数据库RGAP(<http://rice.plant-biology.msu.edu>)和植物基因组数据库phytozome(<https://phytozome.jgi.doe.gov/>)下载水稻(*Oryza sativa* L.)、甜橙(*Citrus sinensis*)及杨树(*Populus* L.)的TMK氨基酸序列,并按照1.2中的方法进行筛选,最终得到2个水稻TMK成员、1个甜橙TMK成员、3个杨树TMK成员。通过MAGA5.05软件对5个物种的氨基酸序列进行多序列比对,采用邻近法构建进化树,其中自展法(Bootstrap)重复次数为1000次。应用在线分析软件MEME(<http://meme-suite.org/tools/meme>)分析DITMKs氨基酸序列保守基序(motif)、InterPro(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)分析DITMKs氨基酸序列的保守结构域,使用TBtools中Pattern Drawers绘制龙眼进化树、保守基序及基因结构图。利用TBtools中Gtf/Gff3 Sequences Extracter提取DITMK基因家族CDS序列上游2000 bp序列作为启动子序列,并提交至在线网站PlantCare(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行启动子顺式作用元件预测,利用Excel统计分析数据并制图。通过龙眼转录组数据库提取DITMKs基因在龙眼体胚发生早期EC、ICpEC及GE这3个阶段的转录组数据(FPKM)平均值,利用TBtools

中的HeatMap绘制热图。

1.4 龙眼 *TMK* 基因家族在龙眼体胚发生早期不同阶段及不同激素处理下的qRT-PCR分析

使用TransZol Up试剂盒(全式金,北京)提取处理后材料的RNA,采用PrimeScript™ IV 1st Strand cDNA Synthesis Mix 试剂盒(宝日医,北京)合成cDNA。通过DNAMAN6.0设计*DITMKs*的qRT-PCR引物(表1),在LightCycler480 qRT-PCR仪器上检测*DITMKs*在体胚发生3个阶段中(EC、IcpEC、GE)及不同激素不同时间处理下的表达量,操作方法参照参考Hieff® qPCR SYBR® Green Master Mix 试剂盒(翊圣,上海),其中内参基因为*DfFSD*,每个处理设置3次生物学重复,利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算*DITMKs*基

表1 *DITMK* 基因家族引物信息

Table 1 Primers information of *DITMK* gene family

引物名称 Primer name	序列(5'—3') Sequences(5'—3')
<i>DITMK1-1</i>	GTTTGTTGGTGCCTTATTGTTG TTGACAGCATTCCATCCC
<i>DITMK1-2</i>	AAGTTTGTGGTTCTGTAGTTGG ACCGCATGAATTTCGACTG
<i>DITMK1-3</i>	TTGACCCACCCAAATCTCTC ACCCGAAATGTTGTTCCACT
<i>DITMK3-1</i>	TCCAAGCAACCACTCATCAG GCAGCAACT CCTATTCCAC
<i>DITMK3-2</i>	AAGACACTTCCAGGCTCCA TTCCACTACTGTTCTGCTTGC
<i>DITMK4</i>	GAACATCAACCTCTTCCCTG TGAATCTCCGACTTGCCG

因的相对表达量,采用Excel统计数据,SPSS软件分析基因表达量间的差异显著性($p < 0.05$),Graphpad软件作图。

2 结果与分析

2.1 *DITMK* 基因家族成员鉴定及蛋白理化性质分析

根据1.2中的方法,在龙眼3代基因组中共筛选得到6条具有富含亮氨酸LRR重复序列且在胞内结构域中具有激酶结构的*DITMK*基因(表2),应用拟南芥*TMK*基因家族命名方法对其命名,其中有3个成员命名为*TMK1*,2个成员命名为*TMK3*,1个成员命名为*TMK4*。*DITMK*基因家族编码的*DITMKs*氨基酸数目在865~962之间,其中数量最多的氨基酸是亮氨酸及丝氨酸,且每个成员带负电荷氨基酸数目(Asp + Glu)均多于带正电荷的氨基酸数目(Arg + Lys);等电点在6.00~6.53之间;分子质量在93.87~104.56 kDa之间,说明*DITMKs*是高分子蛋白。*DITMKs*不稳定系数在32.33~40.67之间,其中仅*DITMK1-3*为不稳定蛋白,其余5个成员均为稳定蛋白。*DITMK*基因家族所有成员编码的蛋白为具有跨膜结构但不具有信号肽的亲水性蛋白,其中*DITMK1-3*与*DITMK3-2*具有2个跨膜结构。根据亚细胞定位预测结果显示,*DITMK*基因家族编码的蛋白主要定位在细胞质、质膜及细胞核上。磷酸化位点预测分析结果显示,主要在胞内结构域中的丝氨酸和苏氨酸位点上发生磷酸化,其中丝氨酸为主要磷

表2 *DITMK* 家族基本理化性质

Table 2 Basic physicochemical property of *DITMK* family

基因名称 Gene name	比对到拟南芥 Blast to Arabidopsis	氨基酸数 Amino acid number	等电点 pI	分子质量 Molecular weight/kD	不稳定系数 Instability index	亲水性 Gravy	信号肽 Singal peptide	跨膜结构数 Transme- mbrane domain	亚细胞定位 Subcellular localization	磷酸化位点 Phosphoryla- tion site
<i>Dlo017805</i> (<i>DITMK1-1</i>)	<i>AtTMK1</i>	932	6.26	100.48	35.92	-0.139	无 No	1	CP	Ser, Thr
<i>Dlo017806</i> (<i>DITMK1-2</i>)	<i>AtTMK1</i>	865	6.30	93.87	37.34	-0.122	无 No	1	CP, EC	Ser, Thr
<i>Dlo021013</i> (<i>DITMK1-3</i>)	<i>AtTMK1</i>	951	6.00	104.16	40.67	-0.128	无 No	2	PM, CP	Ser, Thr
<i>Dlo025931</i> (<i>DITMK3-1</i>)	<i>AtTMK3</i>	962	6.53	104.56	32.33	-0.098	无 No	1	PM	Ser, Thr
<i>Dlo029771</i> (<i>DITMK3-2</i>)	<i>AtTMK3</i>	961	6.12	104.13	39.08	-0.156	无 No	2	NC, CP	Ser, Thr
<i>Dlo002843</i> (<i>DITMK4</i>)	<i>AtTMK4</i>	921	6.24	99.94	38.69	-0.143	无 No	1	NC	Ser, Thr

注:CP. 细胞质;EC. 胞外;PM. 质膜;NC. 细胞核;Ser. 丝氨酸;Thr. 苏氨酸。

Note: CP. Cytoplasm; EC. Extracellular; PM. Plasma Membrane; NC. Nucleus; Ser. Serine; Thr. Threonine.

酸化位点。

2.2 DITMK基因家族成员染色体定位分析

利用TBtools软件绘制得到DITMK全基因组染色体定位分布图,如图1所示。DITMK基因家族中的6个成员随机分布在龙眼的第1、8、9、12、14号染

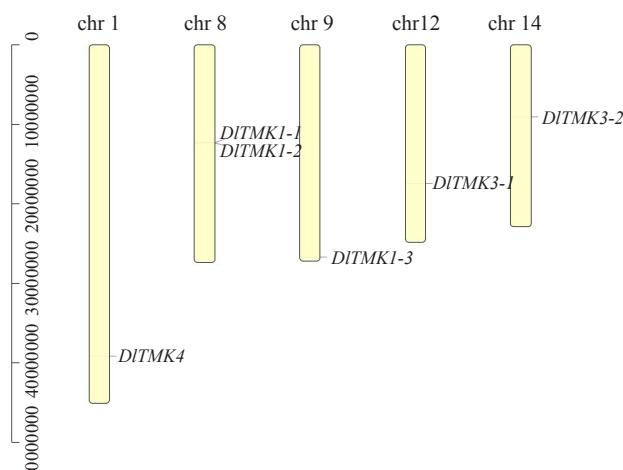


图1 DITMK基因家族染色体定位分析

Fig. 1 Chromosome location analysis of DITMK family

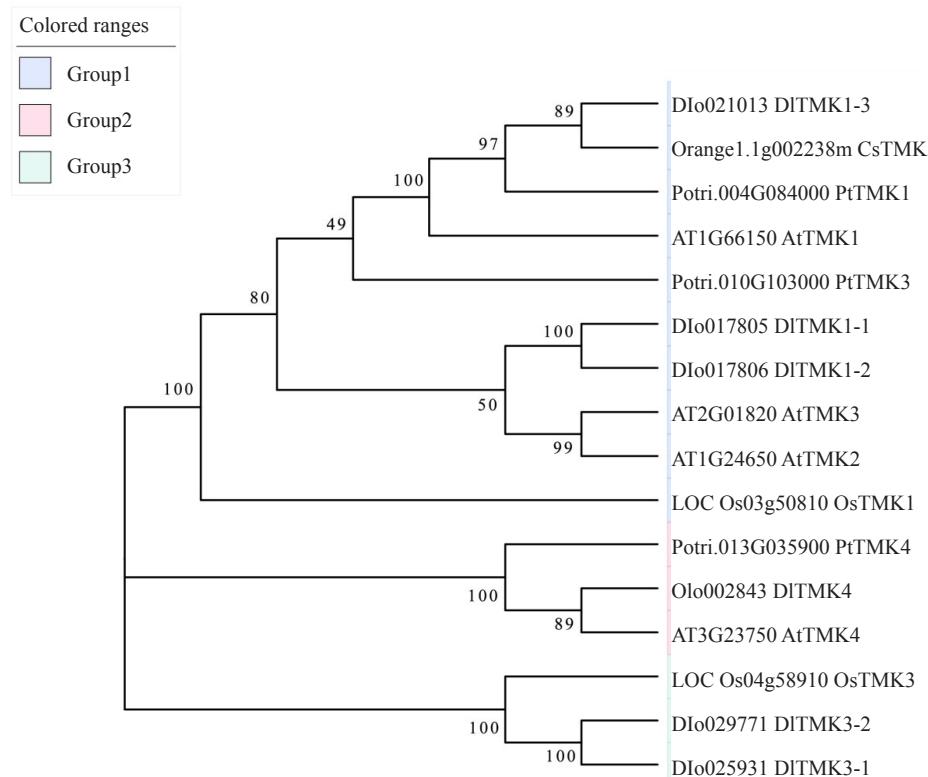
色体上,除8号染色体外,其余染色体上只分布1个基因,DITMK1-1与DITMK1-2为8号染色体上相邻的同源基因,属于串联重复。

2.3 DITMK基因家族系统进化树分析

为更加透彻地解析龙眼与其他物种在进化上的差异,使用软件MAGA建立拟南芥、甜橙、水稻、杨树及龙眼5个物种的进化树(图2)。进化树结构主要分为3大类,其中DITMK1-3与CsTMK1、PtTMK1及AtTMK1亲缘关系较近,可信度为89%~100%,DITMK3-1、DITMK3-2与OsTMK3属于同一分枝,DITMK4与AtTMK4、PtTMK4同源性高,因此预测DITMK基因家族与拟南芥、杨树的进化方式可能比较相近,但各成员的进化方式可能存在差异。

2.4 DITMK基因家族成员氨基酸保守基序(motif)及基因结构分析

为更加全面地了解DITMK基因家族成员氨基酸序列保守基序情况,利用在线软件MEME进行分析,共搜索20个motif(图3-A),命名为motif1~mo-



分支上的数字代表1000次Bootstrap重复验证中该节点的可信度百分率。

Numbers at the nodes represent the Bootstrap values based on 1000 replications.

图2 拟南芥、水稻、甜橙、杨树和龙眼中TMK基因家族成员系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of TMK gene family in *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa L.*, *Citrus sinensis*, *Populus L.* and *Dimocarpus longan*

tif20。其中, motif1~motif11、motif16、motif19等13个基序为6条DITMK所共有的高度保守基序,仅DITMK1-1具有完整的20个motif,DITMK3-1、DITMK3-2与DITMK4都不含motif20,DITMK1-1、DITMK3-1及DITMK3-2具有1个motif19,而DITMK1-2、DITMK1-3与DITMK4拥有2个motif19。DITMK4与其他DITMK在motif种类上差异较大,说明DITMK基因家族成员可能具有相似的功能,但具体

作用方式存在差异。

通过分析DITMK基因家族基因结构发现,所有成员均只含有1个内含子、2个外显子的典型结构(图3-B),且外显子长度与分布差异较小。每个成员胞外结构域均位于氨基酸22~459位点上,具有4~7个LRR重复序列,552~896位点为胞内结构域位置(表3)。结合DITMK基因家族保守基序及基因结构分析,发现DITMK基因家族成员之间可能以功能冗

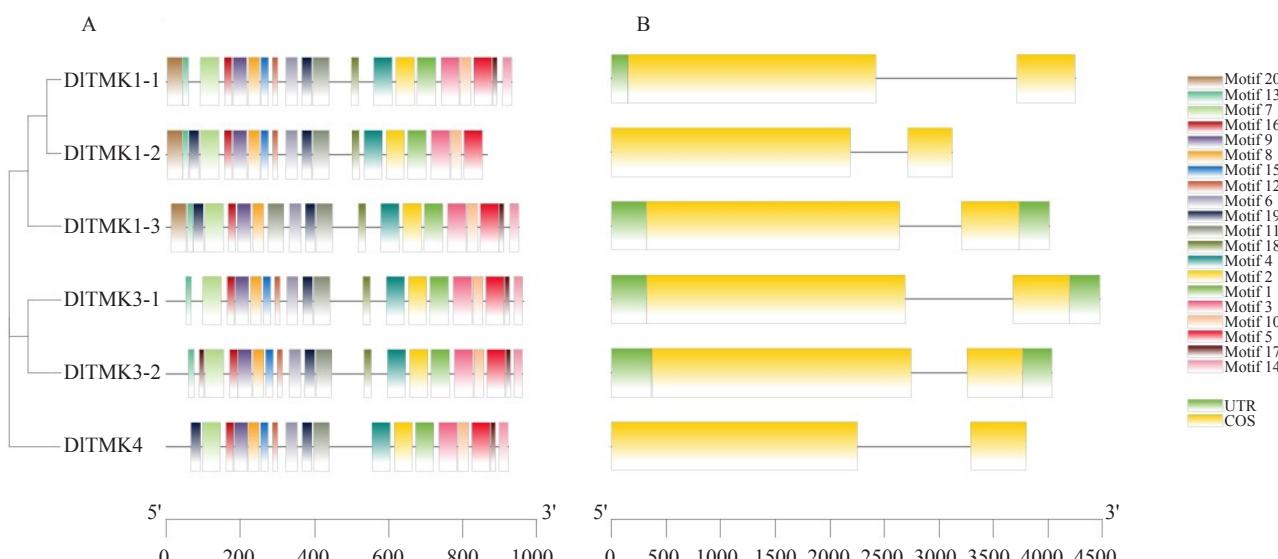


图3 DITMK基因家族氨基酸保守基序(A)及基因结构(B)分析
Fig. 3 Conserved motif (A) and gene structure analysis (B) of DITMK gene family

余的方式发挥作用,介导细胞IAA下游的细胞增殖及分化。

表3 DITMK基因家族保守结构域

Table 3 Conserved domains of DITMK gene family

基因名称 Gene name	胞外结构域位点 Extracellular domain site	LRR结构数量 Number of LRR structures	胞内结构域位点 Intracellular domain site
DITMK1-1	22~450	7	566~871
DITMK1-2	23~450	7	538~843
DITMK1-3	33~459	6	573~882
DITMK3-1	23~456	5	588~896
DITMK3-2	31~449	5	590~891
DITMK4	24~446	4	551~850

2.5 DITMK基因家族成员启动子顺式作用元件分析

通过对DITMK基因家族启动子顺式作用元件进行预测和分析(图4),发现其中具有大量核心元件,如CAAT-box及TATA-box,还包含多种激素响应元件及与逆境胁迫作用相关的响应元件。每个成员

含有5~9种顺式作用元件,DITMK3-1含有的数量最多,DITMK4最少,其中有5个成员含有GA₃响应元件,4个成员含有ABA响应元件,3个成员含有IAA响应元件,说明DITMK可能不仅在IAA信号转导通路中发挥作用,也可能响应GA₃及ABA等激素信号。所有成员均含有光响应元件,5个成员具有厌氧诱导响应元件,少部分成员具有茉莉酸甲酯响应、水杨酸响应、低温胁迫、昼夜控制、玉米醇溶蛋白代谢以及茎尖响应元件等。不同成员间顺式作用元件种类及数量上的差异表明其生物学特性可能存在差异。

2.6 DITMK基因家族在龙眼体胚发生早期表达量的FPKM值分析及qRT-PCR分析

利用龙眼转录组数据库FPKM值绘制DITMK基因家族表达量热图,如图5所示,除DITMK1-3表达量逐渐上升外,其余成员在ICpEC阶段表达量均为最高,且EC阶段表达量均高于GE阶段,DITMK3-

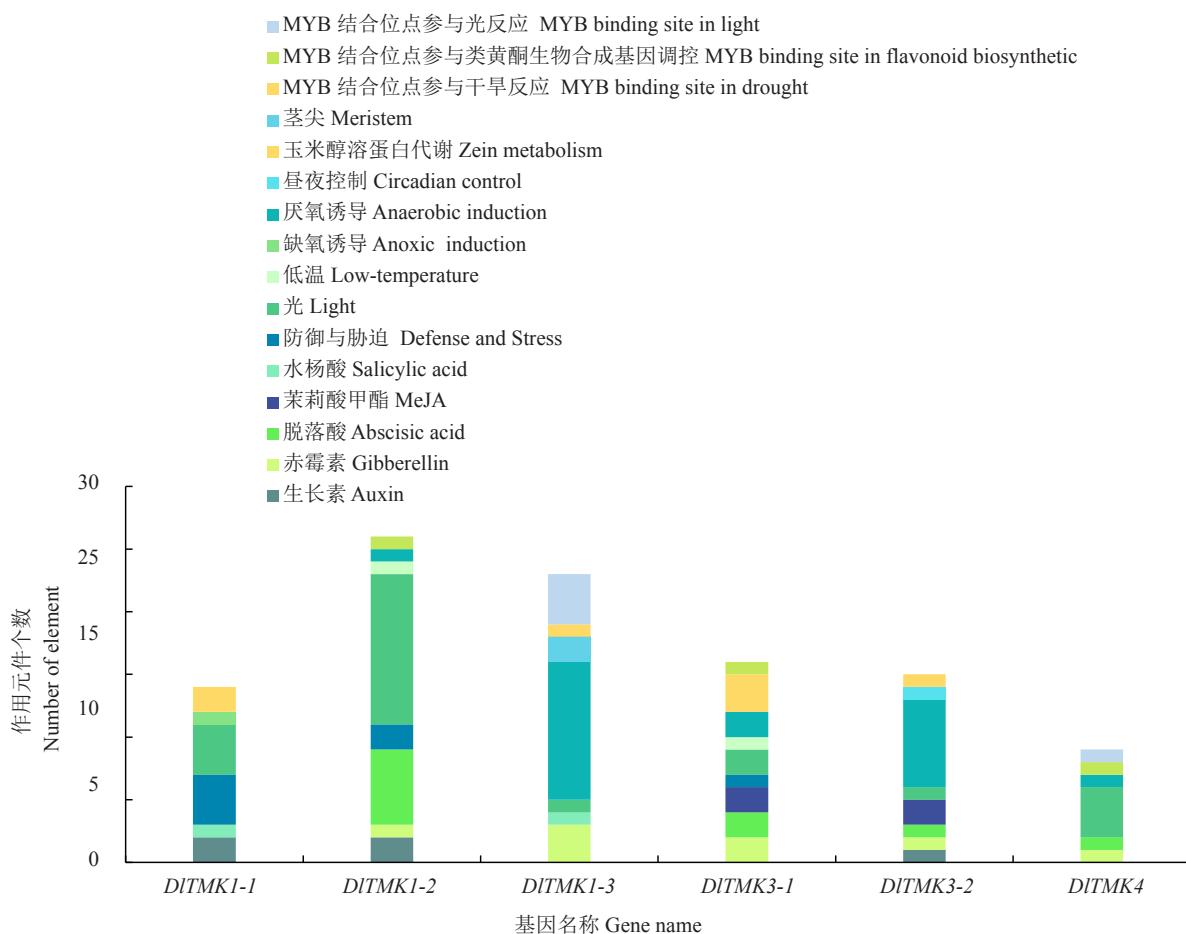


图4 DITMK基因家族启动子顺式作用元件分析
Fig.4 Analysis of cis acting elements of DITMK gene family promoters

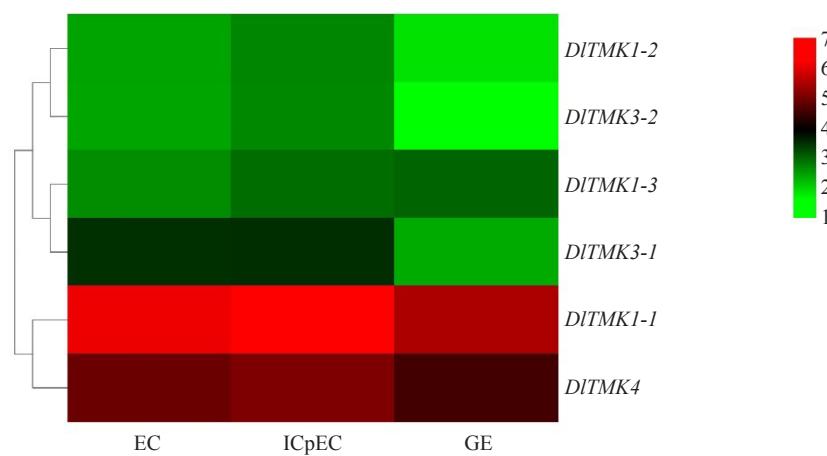


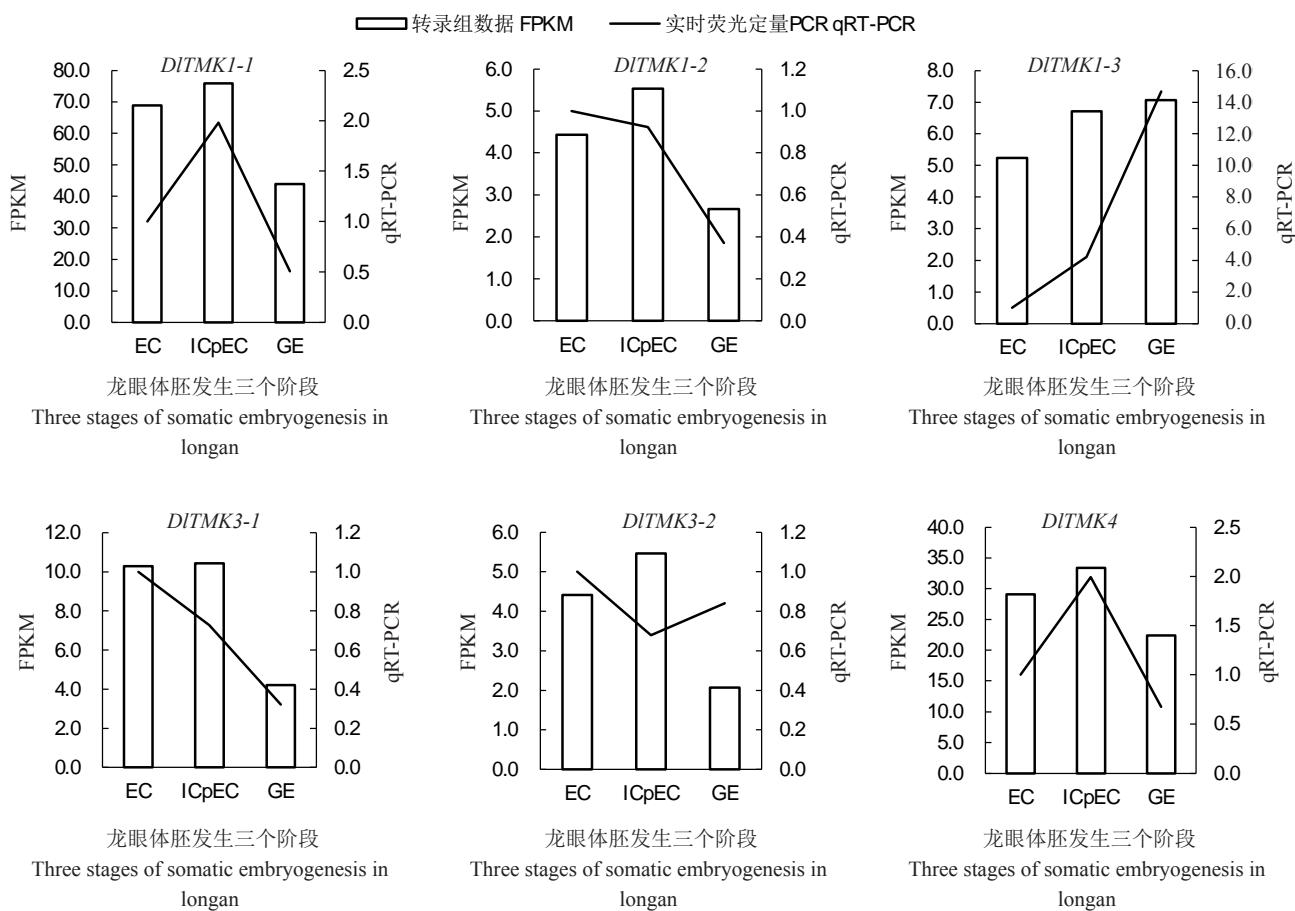
图5 DITMK基因家族成员在龙眼体胚发生不同阶段特异性表达分析

Fig.5 Specific expression at different stages of somatic embryogenesis analysis of DITMK gene family

I在EC及ICpEC阶段表达量相近。

利用qRT-PCR检测DITMK基因家族各成员在龙眼体胚发生早期各阶段的表达状况,发现检测结果中表达量变化趋势与转录组基本一致(图6)。

DITMK1-1、DITMK1-3与DITMK4的转录组变化趋势与实际检测结果相同,DITMK1-2与DITMK3-1在转录组中ICpEC表达量比EC高,但在实际检测中,此阶段表达量要略低于EC阶段。DITMK3-2在

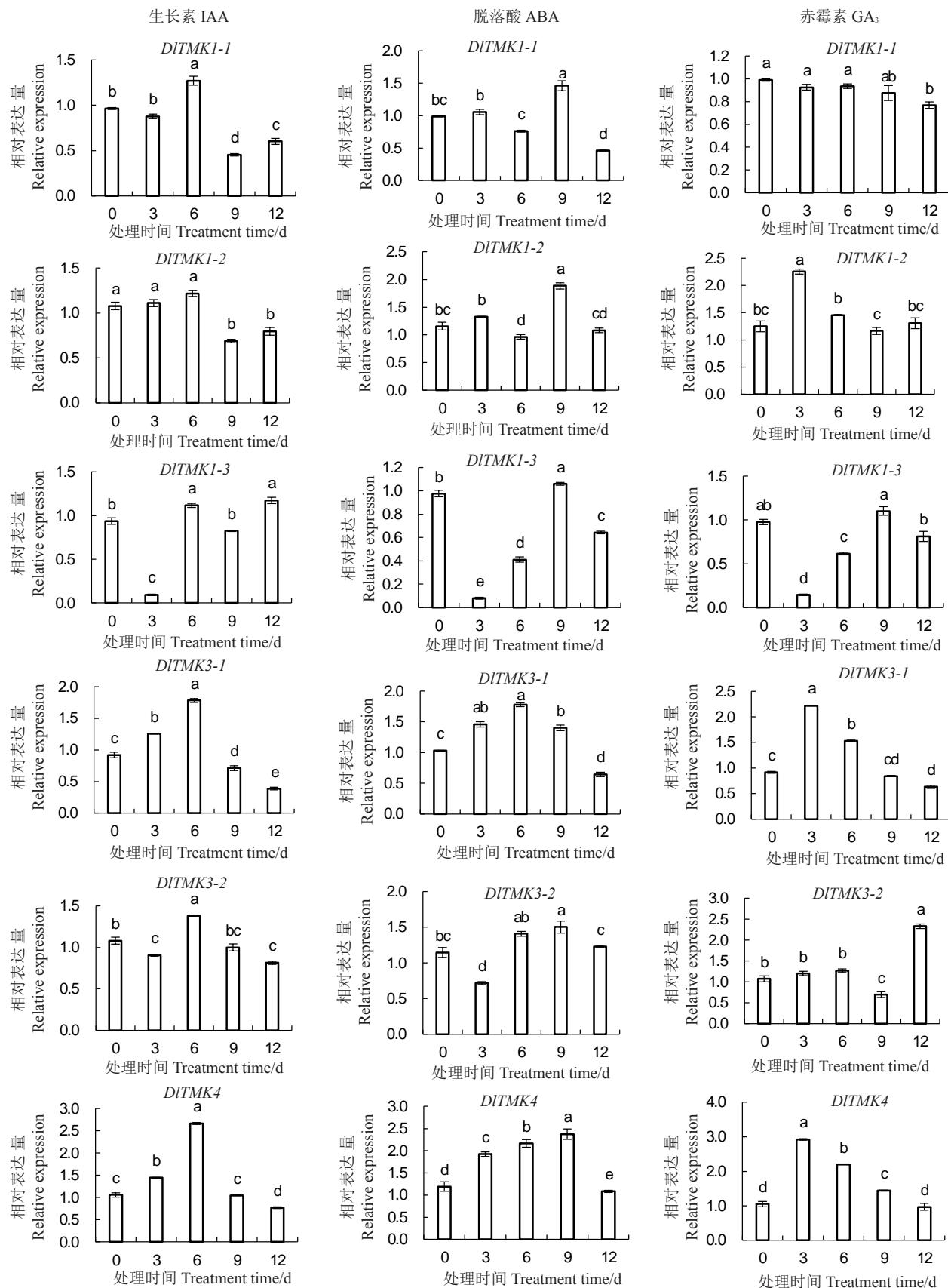
图 6 *DITMK* 基因家族成员在体胚发生早期的相对表达量Fig. 6 Relative expression of *DITMK* gene family in early somatic embryogenesis

ICpEC 阶段的检测表达量为 3 个阶段中最低,与转录组数据中的变化趋势相反,可能为测序误差所致。

2.7 *DITMK* 基因家族在不同激素处理下的 qRT-PCR 分析

结合顺式作用元件分析结果,采用 IAA、GA₃ 和 ABA 对龙眼 EC 进行不同时间处理,利用 qRT-PCR 检测不同激素处理下 *DITMK* 基因家族表达量是否存在显著差异。如图 7 所示,IAA 处理中,*DITMK1-1* 与 *DITMK1-3* 的表达量变化趋势总体呈现“W”形,*DITMK1-1* 从 0~3 d 变化差异不显著,在 6 d 时表达量显著上调并达到峰值,*DITMK1-3* 在 3 d 时表达量显著下调,6 d 时显著上调,12 d 时再次显著上调,在 6、12 d 时差异不显著;*DITMK1-2*、*DITMK3-1* 及 *DITMK4* 表达量呈现出先上升后下降的趋势,在 6 d 时表达量达到峰值;*DITMK3-2* 在 0~6 d 时呈先显著下调再显著上调的趋势,6~12 d 表现为显著下调趋势。ABA 处理中,*DITMK* 基因家族 6 个成员表达量变化趋势两两相同。*DITMK1-1* 与 *DITMK1-2* 的表

达量变化趋势表现为“M”形,在 9 d 时均到达峰值;*DITMK1-3* 与 *DITMK3-2* 在 3 d 时显著下调,随后表达量逐渐上升,在 9 d 时表达量到达峰值,在 12 d 时再次显著下调;*DITMK3-1* 与 *DITMK4* 表达量变化表现出先上升后下降的趋势,其中 *DITMK3-1* 在 6 d 时到达峰值,*DITMK4* 在 9 d 时到达峰值。GA₃ 处理中,*DITMK1-1* 与 *DITMK3-2* 在 0~6 d 时无显著变化,*DITMK1-1* 在 6~12 d 时表达量逐渐下调,*DITMK3-2* 在 6~12 d 表达量先显著下降再显著上升;*DITMK3-1* 与 *DITMK4* 表达量变化趋势一致,且均在 3 d 时到达峰值;*DITMK1-2* 与 *DITMK1-3* 表达量变化趋势相反,*DITMK1-2* 在 3 d 时显著上调,3~9 d 时显著下调,12 d 时表达量上升,但与 9 d 时不具有显著差异,*DITMK1-3* 在 3 d 时显著下调,3~9 d 时显著上调,12 d 时表达量显著下调。此外,*DITMK1-3*、*DITMK3-1* 及 *DITMK4* 在不同处理中表达趋势相似度高,*DITMK4* 在 3 个处理中表达量均为最高,但峰值出现时间因处理存在差异。



不同小写字母表示激素处理间在 0.05 水平的显著性差异; IAA: 生长素; ABA: 脱落酸; GA₃: 赤霉素。

Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level between hormone treatments; IAA: auxin; ABA: abscisic acid; GA₃: gibberellin.

图 7 DlTMK 基因家族成员在不同激素处理下的相对表达量

Fig. 7 Relative expression of *DlTMK* gene family under different hormone treatments

3 讨 论

3.1 龙眼 *TMK* 基因家族成员扩张动力和进化特性

植物通过不同的机制来响应和适应不断变化的环境,富含亮氨酸的类受体蛋白激酶是植物跨膜信号蛋白中最大的1个家族,在植物生长发育和胁迫响应中都具有至关重要的作用^[27-28]。根据类受体蛋白激酶胞外结构域的差异,可至少分为17个不同的亚族,跨膜激酶TMK家族属于其中的1个小亚族^[29]。通过系统性分析,发现*DlTMK*基因家族均为只含有1个内含子、2个外显子的简单结构,且每个内含子固定在特定位置上,与前人研究结果一致^[4]。*DlTMK*基因家族成员编码的6个*DlTMK*主要定位在细胞质质膜、细胞质和细胞核上,推测是由于高浓度IAA导致*DlTMK*羧基末端裂解并转入细胞核内^[11]。研究发现,节段复制和串联重复为植物中基因家族扩展的2个主要原因,串联重复是单个染色体上的相邻同源基因,低串联重复主要包括一些高度保守的关键调控基因家族^[30-31]。在*DlTMK*基因家族染色体定位中发现*DlTMK1-1*与*DlTMK1-2*为串联重复,串联重复率为33.33%,推测这为*DlTMK*基因家族扩展提供了可能性。

笔者在本研究中发现*DlTMK*基因家族不同成员分别与甜橙、水稻、杨树和拟南芥存在较近的亲缘关系,说明*TMK*基因在双子叶植物与单子叶植物中进化较为保守,可能具有相似的进化方式。植物转录水平中启动子顺式作用元件为关键调控因素之一,通过研究植物启动子顺式作用元件可以了解对应基因的响应模式^[32]。*DlTMK*基因家族6个成员均具有多种顺式作用元件,其中IAA、GA₃、ABA为主要响应激素。前人研究已经证明,*TMK*基因为IAA信号通路中的关键基因,可通过与多种IAA响应蛋白形成蛋白复合体,从而调控下游基因的表达^[12]。多数*TMK*基因家族成员具有光响应元件及厌氧诱导响应,说明其对逆境胁迫具有一定作用,且不同成员具有的顺式元件种类及数量都不同,表明在生物学特性上可能存在差异。笔者在本研究中将转录组数据与龙眼体胚发生早期的*DlTMK*基因家族表达量变化趋势进行对比,发现大多数成员检测数据与转录组基本一致,在ICpEC阶段表达量达到峰值,但*DlTMK3-2*与转录组数据差异较大,在ICpEC阶段表达量最低,与Everaert等^[33]发现的转录组基因表

达量与qRT-PCR测定结果具有较高的相关性,但并非完全相同的结论一致,且*DlTMK*基因家族成员在体胚发生早期不同阶段差异表达,表明不同成员可能在不同阶段发挥作用。

3.2 龙眼 *DlTMK* 基因家族成员可能通过参与多种激素应答从而调控体胚发生

赖钟雄等^[34]发现IAA在龙眼体胚发生早期维持较高水平,在球形胚阶段之后呈显著下降趋势,表明IAA能够促进龙眼体胚早期的发育;GA₃含量总体呈持续下降趋势,对体胚发育具有副作用;ABA在各个时期总体含量都比IAA与GA₃低,主要在体胚成熟期起作用。在顺式作用元件中,笔者发现*DlTMK*基因家族主要响应3种激素,以此为依据,对龙眼体胚进行处理。通过qRT-PCR验证不同激素处理下体胚发生早期不同阶段*DlTMK*基因家族成员的表达趋势,发现在IAA处理中,*DlTMK1-2*、*DlTMK3-1*和*DlTMK4*表达量变化趋势为先上升后下降,有83.66%的成员表达量峰值出现在第6天,其中*DlTMK4*表达量最高。研究发现,IAA可通过*TMK4*激活丝裂原活化蛋白激酶信号来控制拟南芥侧根发育过程中的细胞分裂,部分IAA可通过*TMK4*诱导IAA合成关键酶TAA1的苏氨酸101位点磷酸化,调控内源IAA的合成,推测在龙眼体胚发生早期中可能主要由*DlTMK4*调控内源IAA浓度,控制细胞分裂进程^[7,14]。在ABA处理中,*DlTMK1-1*与*DlTMK1-2*,*DlTMK1-3*与*DlTMK3-2*,*DlTMK3-1*与*DlTMK4*表达量变化趋势两两一致,且除*DlTMK1-3*外,5个成员的表达量相当,这与前人研究发现的*AtTMK*不同成员在不同器官及不同发育阶段差异表达但*AtTMK1*、*AtTMK3*与*AtTMK4*表达水平相当的结论一致^[5]。在GA₃处理中,66.66%的成员在体胚发生早期不同时间段高表达,推测*DlTMK*基因家族响应GA₃,与Esther等^[23]发现*OsTMK*基因家族响应GA₃、在细胞分裂旺盛区高表达、在非生长区域低表达的结论相似。综上所述,*DlTMK*基因家族成员可能参与多种激素响应,从而调控体胚发生。

蛋白质的可逆磷酸化在植物生长发育过程中发挥着至关重要的作用,与信号转导、代谢调控及非生物胁迫响应等密切相关^[35-36]。植物类受体蛋白激酶家族的磷酸化位点位于胞内激酶结构域上,当识别信号分子后,通过磷酸化或去磷酸化来调控下游靶基因,传递跨膜信号,调节植物生长发育^[37]。研究发

现, *AtTMK* 基因家族成员同样通过磷酸化来调控下游靶基因的表达, 传递IAA信号, 调控拟南芥根系发育^[5, 7, 14]。笔者在本研究中发现 *DlTMK* 基因家族响应多种激素, 6个成员在龙眼体胚发生早期不同时间段高表达, 推测 *DlTMK* 基因家族成员通过胞内结构域上的磷酸化位点发生磷酸化, 从而调控下游基因表达, 传递跨膜信号, 响应各种激素。

参考文献 References:

- [1] CHANG C, BLEECKER A B, KWOK S F, MEYEROWITZ E M. Molecular cloning approach for a putative ethylene receptor gene in *Arabidopsis*[J]. Biochemical Society Transactions, 1992, 20 (1):73-75.
- [2] CHO H S, PAI H S. Cloning and characterization of *ntTMK1* gene encoding a TMK1-homologous receptor-like kinase in tobacco[J]. Molecules and Cells, 2000, 10 (3):317-324.
- [3] MATSUSHIMA N, MIYASHITA H. Leucine-rich repeat (LRR) domains containing intervening motifs in plants[J]. Biomolecules, 2012, 2 (2):288-311.
- [4] CHANG C, SCHALLER G E, PATTERSON S E, KWOK S F, MEYEROWITZ E M, BLEECKER A B. The TMK1 gene from *Arabidopsis* codes for a protein with structural and biochemical characteristics of a receptor protein kinase[J]. The Plant Cell, 1992, 4 (10):1263-1271.
- [5] DAI N, WANG W Y, PATTERSON S E, BLEECKER A B. The TMK subfamily of receptor-like kinases in *Arabidopsis* display an essential role in growth and a reduced sensitivity to auxin[J]. PLoS One, 2013, 8 (4):e60990.
- [6] CHEN H, KONG Y, CHEN J, LI L, LI X S, YU F, MING Z H. Crystal structure of the extracellular domain of the receptor-like kinase TMK3 from *Arabidopsis thaliana*[J]. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications, 2020, 76 (8):384-390.
- [7] HUANG R F, ZHENG R, HE J, ZHOU Z M, WANG J C, XIONG Y, XU T D. Noncanonical auxin signaling regulates cell division pattern during lateral root development[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116 (42):21285-21290.
- [8] KEPINSKI S, LEYSER O. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor[J]. Nature, 2005, 435 (7041):446-451.
- [9] TAN X, CALDERON- VILLALOBOS L, SHARON M, ZHENG C X, ROBINSON C V, ESTELLE M, ZHENG N. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase[J]. Nature, 2007, 446 (7136):640-645.
- [10] SINGH G, RETZER K, STANISLAV V, NAPIER R. Advances in understanding the mechanism of action of the auxin permease AUX1[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19 (11):3391-3402.
- [11] CAO M, CHEN R, LI P, YU Y Q, ZHENG R, GE D F, ZHENG W, WANG X H, GU Y T, GELOVÁ Z, FRIML J, ZHANG H, LIU R Y, HE J, XU T D. TMK1-mediated auxin signalling regulates differential growth of the apical hook[J]. Nature: International Weekly Journal of Science, 2019, 568 (7751):240-243.
- [12] 马军, 徐通达. 植物非经典生长素信号转导通路解析[J]. 生物技术通报, 2020, 36 (7):15-22.
MA Jun, XU Tongda. Non-canonical auxin signaling pathway in plants[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36 (7):15-22.
- [13] MARQUÈS-BUENO M M, ARMENGOT L, NOACK L C, BAREILLE J, RODRIGUEZ L, PLATRE M P, BAYLE V, LIU M, OPDENACKER D, VANNESTE S, MÖLLER B K, NIMCHUK Z L, BEECKMAN T, CAÑO-DELGADO A, FRIML J, JAILLAIS Y. Auxin-regulated reversible inhibition of TMK1 signaling by MAKR2 modulates the dynamics of root gravitropism[J]. Current Biology, 2021, 31 (1):228-237.
- [14] WANG Q, QIN G C, CAO M, CHEN R, HE Y M, YANG L Y, ZENG Z J, YU Y Q, GU Y T, XING W M, TAO W A, XU T D. A phosphorylation-based switch controls TAA1-mediated auxin biosynthesis in plants[J]. Nature Communications, 2020, 11 (1):377-407.
- [15] XU T D, NAGAWA S, YANG Z B. Uniform auxin triggers the Rho GTPase-dependent formation of interdigititation patterns in pavement cells[J]. Small GTPases, 2011, 2 (4):227-232.
- [16] XU T D, DAI N, CHEN J, SHINGO N, CAO M, LI H J, ZHOU Z M, CHEN X, DE R R, HANA R, WANG W Y, JONES A M, FRIML J, PATTERSON S E, BLEECKER A B, YANG Z B. Cell surface ABP1-TMK auxin-sensing complex activates ROP GTPase signaling[J]. Science, 2014, 343 (6174):1025-1028.
- [17] 梁洁, 金青青, 黄团心, 徐晖, 麦嘉妮, 信晨曦. 龙眼叶不同极性部位对2型糖尿病小鼠的降血糖作用研究[J]. 中国药房, 2018, 29 (7):950-954.
LIANG Jie, JIN Qingqing, HUANG Tuanxin, XU Hui, MAI Jianyi, XIN Chenxi. Study on hypoglycemic effects of different polar parts from the leaves of *Dimocarpus longan* on Type 2 diabetes mellitus mice[J]. China Pharmacy, 2018, 29 (7):950-954.
- [18] BAI Y J, JIA X C, HUANG F, ZHANG R F, DONG L H, LIU L, ZHANG M W. Structural elucidation, anti-inflammatory activity and intestinal barrier protection of longan pulp polysaccharide LP11a[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 246:116532.
- [19] RONG Y, YANG R L, YANG Y Z, WEN Y Z, LIU S X, LI C F, HU Z Y, CHENG X G, LI W. Structural characterization of an active polysaccharide of longan and evaluation of immunological activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 213:247-256.
- [20] CHEN Y K, XU X P, CHEN X H, CHEN Y, ZHANG Z H, XU H, LIN Y L, LAI Z X. Seed-specific gene MOTHER of FT and TFL1(MFT) involved in embryogenesis, hormones and stress responses in *Dimocarpus longan* Lour.[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19 (8):e2403.
- [21] 陈裕坤, 林晓艺, 赖钟雄. 龙眼体细胞胚胎发生研究进展[J].

- 热带作物学报,2020,41 (10):1990-2002.
- CHEN Yukun, LIN Xiaoyi, LAI Zhongxiong. Advances in somatic embryogenesis of *Dimocarpus longan* Lour.[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41 (10): 1990-2002.
- [22] 赖钟雄. 龙眼生物技术研究[M]. 福州:福建科学技术出版社, 2003.
- LAI Zhongxiong. Biotechnology research of *Longan*[M]. Fuzhou:Fujian Science and Technol Press, 2003.
- [23] VAN DER KNAAP E, SONG W Y, RUAN D L, SAUTER M, RONALD P C, KENDE H. Expression of a gibberellin-induced leucine-rich repeat receptor-like protein kinase in deepwater rice and its interaction with kinase-associated protein phosphatase[J]. Plant Physiology, 1999, 120 (2):559-570.
- [24] 李盼盼,肖爽,孙燕川,刘超杰,韩莹琰,郝敬虹,范双喜. 叶用莴苣 *LsTMK1* 基因的克隆及高温胁迫条件下的表达分析[J]. 北京农学院学报,2018,33 (4):19-25.
- LI Panpan, XIAO Shuang, SUN Yanchuan, LIU Chaojie, HAN Yingyan, HAO Jinghong, FAN Shuangxi. Cloning and expression analysis of *LsTMK1* gene in lettuce (*Lactuca sativa* L.) under high temperature stress[J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2018, 33(4):19-25.
- [25] LIN Y L, MIN J M, LAI R L, WU Z Y, CHEN Y L, YU L L, CHENG C Z, JIN Y C, TIAN Q L, LIU Q F, LIU W H, ZHANG C G, LIN L X, HU Y, ZHANG D M, THU M, ZHANG Z H, LIU S C, ZHONG C S, FANG X D, WANG J, YANG H M, VARSHNEY R K, YIN Y, LAI Z X. Genome-wide sequencing of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) provides insights into molecular basis of its polyphenol-rich characteristics[J]. GigaScience, 2017, 6 (5):1-14.
- [26] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS H R, FRANK M H, HE Y H, XIA R. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13 (8):1194-1202.
- [27] MENG J, YANG J, PENG M, LIU X L, HE H B. Genome-wide characterization, evolution, and expression analysis of the leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (*LRR-RLK*) gene family in *Medicago truncatula*[J]. Life, 2020, 10 (9): 176.
- [28] SUN J M, LI L T, WANG P, ZHANG S L, WU J Y. Genome-wide characterization, evolution, and expression analysis of the leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (*LRR-RLK*) gene family in *Rosaceae genomes*[J]. BMC Genomics, 2017, 18 (1): 763-777.
- [29] SHIU S H, ANTHONY B B. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98 (19):10763-10768.
- [30] CANNON S B, MITRA A, BAUMGARTEN A, YOUNG N D, MAY G. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*[J]. BMC Plant Biology, 2004, 4 (1):796-815.
- [31] ZHU Y, WU N N, SONG W L, YIN G J, QIN Y J, YAN Y M, HU Y K. Soybean (*Glycine max*) expansin gene superfamily origins: segmental and tandem duplication events followed by divergent selection among subfamilies[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14 (1):93.
- [32] 李田,孙景宽,刘京涛. 植物启动子研究进展[J]. 生物技术通报,2015,31 (2):18-25.
- LI Tian, SUN Jingkuan, LIU Jingtao. Research progress on plant promoters[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31 (2):18-25.
- [33] EVERAERT C, LUYPERT M, MAAG J L V, CHENG Q X, DINGER M E, HELLEMANS J, MESTDAGH P. Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using whole-transcriptome RT-qPCR expression data[J]. Scientific Reports, 2017, 7 (1):621-628.
- [34] 赖钟雄,陈春玲. 龙眼体细胞胚胎发生过程中的内源激素变化[J]. 热带作物学报,2002,23(2):41-47.
- LAI Zhongxiong, CHEN Chunling. The changes of the contents of endogenous hormone in the process of somatic embryogenesis from embryogenic callus in longan[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2002,23(2):41-47.
- [35] 刘静,李亚超,周梦岩,吴鹏飞,马祥庆,李明. 植物蛋白质翻译后修饰组学研究进展[J]. 生物技术通报,2021,37 (1):67-76.
- LIU Jing, LI Yachao, ZHOU Mengyan, WU Pengfei, MA Xiangqing, LI Ming. Advances in the studies of plant protein post-translational modification[J]. Biotechnology Bulletin, 2021,37 (1):67-76.
- [36] OSAWA J, AKIZUKI K, KASHIMURA A, UETA S, NAKATANI M, INUI Y, SHIGERI Y, ISHIDA A, KAMESHITA I, SU-EYOSHI N. Dual phosphorylation of protein phosphatase PPM1H promotes dephosphorylation of Smad1 in cellulose[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 530 (3):513-519.
- [37] 闫峰,祝传书,庞保平. 植物类受体蛋白激酶的研究进展[J]. 西北植物学报,2009,29 (4):851-858.
- YAN Feng, ZHU Chuanshu, PANG Baoping. Advance in research of plant receptor-like protein kinases[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalis Sinica, 2009, 29 (4):851-858.